Série A, n° 786
N° d'ordre :
1573

# THÈSES

PRÉSENTÉES

## A LA FACULTÉ DES SCIENCES
## DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

**Thérèse ROBERT**
AGRÉGÉE DE L'UNIVERSITÉ

---

**1re THÈSE.** — Recherches sur le Rôle physiologique du Calcium chez les Végétaux.

**2e THÈSE.** — Propositions données par la Faculté.

---

**Soutenues le** 23 Xbre **1915 devant la Commission d'examen.**

JURY :

*Président* : MM. A. DASTRE

*Examinateurs* { Gabriel BERTRAND
Léon BERTRAND

---

LAVAL
L. BARNÉOUD & Cie, IMPRIMEURS

1915

Série A, n° 786
N° d'ordre :
1573

# THÈSES

PRÉSENTÉES

## A LA FACULTÉ DES SCIENCES
## DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR


**Thérèse ROBERT**
AGRÉGÉE DE L'UNIVERSITÉ


---

**1re THÈSE.** — Recherches sur le Rôle physiologique du Calcium chez les Végétaux.

**2e THÈSE.** — Propositions données par la Faculté.

---

**Soutenues le** 23 4bre **1915 devant la Commission d'examen**


R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN


JURY :

*Président :* MM. A. DASTRE
*Examinateurs* { Gabriel BERTRAND
Léon BERTRAND

---


LAVAL
L. BARNÉOUD & Cie, IMPRIMEURS

1915

# FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

| | MM | |
|---|---|---|
| *Doyen* | P. APPELL, *Profess.* | Mécanique analytique et mécan. céleste |
| *Doyen honoraire* | G. DARBOUX, — | Géométrie supérieure. |
| *Profess. honoraires.* | Ch WOLF | |
| | J. RIBAN. | |
| *Professeurs* | LIPPMANN | Physique |
| | BOUTY | Physique. |
| | BOUSSINESQ | Phys. mathém. et calcul des probabilités. |
| | PICARD | Analyse supér. et algèbre supérieure |
| | Y. DELAGE | Zoologie, anatomie, physiologie compar. |
| | G. BONNIER | Botanique. |
| | DASTRE | Physiologie |
| | KOENIGS | Mécanique physique et expérimentale. |
| | VÉLAIN | Géographie physique. |
| | GOURSAT | Calcul différentiel et calcul intégral. |
| | HALLER | Chimie organique. |
| | JOANNIS | Chimie (Enseignement P. C. N.). |
| | JANET | Physique — |
| | WALLERANT | Minéralogie. |
| | ANDOYER | Astronomie. |
| | PAINLEVÉ | Mécanique rationnelle. |
| | HAUG | Géologie. |
| | HOUSSAY | Zoologie. |
| | H. LE CHATELIER. | Chimie. |
| | G. BERTRAND | Chimie biologique. |
| | Mme P. CURIE | Physique générale. |
| | CAULLERY | Zoologie (Évolution des êtres organisés) |
| | C. CHABRIÉ | Chimie appliquée. |
| | G. URBAIN | Chimie |
| | EMILE BOREL | Théorie des fonctions. |
| | MARCHIS | Aviation. |
| | JEAN PERRIN | Chimie physique. |
| | G. PRUVOT | Zoologie, anatomie, physiol. comparée |
| | MATRUCHOT | Botanique. |
| | ABRAHAM | Physique. |
| | CARTAN | Calcul différentiel et calcul intégral. |
| | Cl. GUICHARD | Mathématiques générales. |
| | MOLLIARD | Physiologie végétale. |
| | N | Application de l'analyse à la géométrie. |
| | N | Histologie. |
| *Professeurs-adjoints.* | PUISEUX | Mécanique et Astronomie. |
| | LEDUC | Physique. |
| | MICHEL | Minéralogie. |
| | HEROUARD | Zoologie. |
| | LÉON BERTRAND | Géologie. |
| | RÉMY PERRIER | Zoologie (Enseignement P. C. N.). |
| | COTTON | Physique. |
| | LESPIEAU | Chimie. |
| | GENTIL | Pétrographie. |
| | SAGNAC | Physique (Enseignement P. C. N.). |
| | PEREZ | Zoologie (Evolution des êtres organisés). |
| *Secrétaire* | D. TOMBECK | |

A MONSIEUR LE DOCTEUR E. ROUX

MEMBRE DE L'INSTITUT ET DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE,
DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR.

A MONSIEUR GABRIEL BERTRAND

PROFESSEUR A LA FACULTÉ DES SCIENCES,
CHEF DE SERVICE A L'INSTITUT PASTEUR.

*HOMMAGE DE RECONNAISSANCE.*

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550413_0009

# INTRODUCTION

## Classification des éléments chimiques d'après leur rôle dans la végétation

Depuis que les travaux de de Saussure, Liebig, Sachs, Boussingault, G. Ville, Pasteur, Raulin ont montré le rôle absolument prépondérant joué par les substances minérales dans la vie des végétaux, de nombreuses recherches ont été entreprises pour établir la liste des éléments qui interviennent dans la biologie des plantes et pour essayer d'expliquer leur mode d'action.

La plupart des techniques suivies par les phytophysiologistes dans ces recherches peuvent se rattacher à deux méthodes principales.

L'une consiste à étudier les végétaux développés sur un milieu naturel et à caractériser chimiquement les substances qui entrent dans leur composition : c'est la **méthode analytique.** Cette méthode a permis de déceler jusqu'ici chez les êtres vivants une trentaine de corps simples.

Les indications données par ce procédé sont des plus intéressantes, mais peuvent-elles nous suffire ? On sait — et nous en verrons des exemples dans le cours de ce travail — que les plantes possèdent la faculté de fixer, non seulement les éléments qui leur sont nécessaires, mais encore, dans une certaine

mesure, ceux qui leur sont indifférents ou même nuisibles. On peut donc s'attendre à trouver dans le végétal, en proportions plus ou moins considérables, la plupart des métalloïdes et des métaux existant dans le milieu où il s'est développé.

Comment savoir, parmi tous ces corps, ceux qui jouent réellement un rôle dans la vie de la plante, et ceux qui s'y rencontrent simplement parce que présents dans le substratum ?

La réponse à cette question est donnée par l'emploi de la **méthode synthétique**. Cette méthode consiste à remplacer le terrain naturel par un milieu artificiel formé de composés chimiques définis appropriés aux besoins du végétal qui doit s'y développer. Les renseignements fournis par la première méthode servent à constituer un tel milieu. On détermine le degré d'utilité des différents éléments et leur mode d'action en les retranchant ou en les ajoutant au substratum et en variant leur proportion.

La méthode analytique qui a servi de point de départ à la méthode synthétique doit aussi lui venir en aide en tant que moyen de vérification.

Quels sont les résultats obtenus par l'emploi de ces deux méthodes ?

Les premières recherches sur la **composition des végétaux** ont permis d'y caractériser d'une façon constante une dizaine d'éléments : l'*hydrogène*, l'*oxygène*, le *carbone*, l'*azote*, le *soufre*, le *phosphore*, le *potassium*, le *calcium*, le *magnésium*, le *fer*.

Le *silicium* a été trouvé en quantité notable dans certaines familles, telles que les graminées ; le *chlore* et le *sodium* dans toutes les plantes marines. L'analyse plus attentive des cendres végétales a établi que ces trois derniers éléments s'y rencontrent toujours, mais en très petites proportions ; de même que le *manganèse* et l'*aluminium*.

Enfin le perfectionnement des techniques a amené la découverte de toute une série d'autres corps :

L'*iode* et le *brome* en quantités appréciables dans les plantes marines et à l'état de traces dans la plupart des autres ; le *fluor* dans le pois et l'orge ; l'*arsenic* et le *bore* à peu près partout où on les a recherchés ; le *rubidium* et le *cæsium* dans la betterave ; le *lithium* dans quelques plantes ; le *baryum* dans divers arbres et arbrisseaux ; le *strontium* dans *Fucus vesiculosus* ; le *zinc* et le *cuivre* dans les espèces végétales les plus variées ; le *plomb*, en même temps que le *vanadium*, le *molybdène* et le *chrome* dans le bois de plusieurs arbres ; le *cobalt* dans *Zosteria maritima* ; enfin l'*argent* dans le *Fucus*.

Il n'est pas impossible que des recherches encore plus minutieuses et plus étendues ne permettent de découvrir dans les végétaux encore d'autres éléments que ceux que nous venons de signaler.

Lorsque par l'emploi de la méthode synthétique, on veut déterminer le degré d'utilité de ces différentes substances dans la nutrition des végétaux, on se heurte à une difficulté qui, bien souvent, enlève toute certitude aux résultats obtenus. Nous verrons plus loin que certains corps agissent à des doses infinitésimales ; lorsqu'on veut juger de leur influence en les supprimant du substratum, on n'est jamais sûr, malgré tous les soins apportés à la purification du milieu, qu'il n'y subsiste des traces de ces corps suffisantes pour permettre le développement du végétal.

Si l'on s'en tient pourtant aux données que l'on possède actuellement, on peut — au point de vue de leurs relations avec la vie de la plante — grouper comme suit les différents éléments :

Certains d'entre eux ont une importance telle que lorsqu'on réussit à les éliminer, la plante ne pousse plus : ce sont les *éléments nécessaires* ou *physiologiques* ; par exemple, le magnésium pour les champignons.

Quelquefois, l'élément nécessaire l'est à si petites doses qu'il est impossible d'en débarrasser suffisamment le milieu pour arriver à annuler la récolte ; on parvient seulement, en purifiant le mieux possible tous les produits employés, à la faire

baisser dans une proportion plus ou moins grande. C'est ce qui a été constaté pour le manganèse et le zinc dans la culture de l'*Aspergillus niger*.

L'étude de l'influence des métaux rares sur la végétation a conduit à penser que certains corps peuvent favoriser la croissance de la plante sans lui être indispensables. C'est ainsi que l'uranium active le développement du bacille pyocyanique sans qu'on puisse pourtant considérer cet élément comme normal dans le milieu de culture du bacille. A côté des éléments nécessaires, il faut donc faire une place aux *éléments simplement utiles*. On peut aussi ranger dans cette catégorie les substances qui interviennent indirectement dans la vie du végétal en agissant sur le milieu, par exemple en modifiant sa réaction.

Quelques corps ajoutés au substratum paraissent n'exercer aucune influence sur l'évolution de certains végétaux, par exemple le bore inactif vis-à-vis des moisissures : ce sont les *éléments indifférents*. Mais il faut être très circonspect lorsqu'il s'agit de placer une substance dans cette catégorie. Nous verrons en effet que le perfectionnement des méthodes a permis, dans bien des cas, de mettre en évidence le rôle nécessaire ou utile de corps dont on avait longtemps méconnu l'action.

On sait que la toxicité est une propriété non pas qualitative, mais quantitative ; tous les éléments nécessaires, utiles ou indifférents peuvent l'acquérir si l'on augmente suffisamment leur concentration. Pourtant certains corps sont déjà nuisibles à des doses si faibles qu'il est permis de créer pour eux la catégorie des *éléments toxiques* dans laquelle nous rangerons par exemple le mercure et l'argent. Raulin a montré que ce dernier élément entrave le développement de l'*Aspergiltus niger*, même lorsqu'il existe dans le milieu à une dilution telle qu'il n'est plus décelable par les réactifs chimiques ordinaires. G. Bertrand a établi que cette action nuisible se fait encore sentir pour 0 gr. 0001 de métal par litre de liquide nutritif.

Cette classification des éléments d'après leur utilité relative dans la vie de la plante demande peut-être à être complétée. Il s'agit en effet de savoir si un corps dont on a prouvé la

nécessité pour certains organismes est forcément indispensable à tous les autres. Ne peut-on pas concevoir qu'une substance soit nécessaire à un groupe d'individus déterminés et indifférente pour quelques autres ?

La démonstration de cette hypothèse est rendue malaisée par la difficulté de ranger avec certitude un corps dans la catégorie des éléments indifférents.

Pourtant Agulhon, se basant sur le résultat de ses expériences sur le bore, propose la classification suivante :

« *Eléments fondamentaux*, nécessaires à tous les êtres vivants ;

« *Eléments particuliers*, caractéristiques d'un groupe d'individus, d'une vie dans des conditions particulières. »

Lorsque le physiologiste est parvenu à classer un corps dans l'une des catégories précédentes, sa tâche n'est pas achevée ; il doit encore, s'il s'agit d'un élément nécessaire ou utile, s'efforcer d'en déterminer le **mode d'action**.

Nous avons déjà laissé entendre que certaines substances interviennent à des doses extrêmement faibles. D'autres, au contraire, sont nécessaires à la plante en quantités relativement considérables. Il est logique d'admettre que ces différences dans la grandeur des doses agissantes correspondent à des fonctions distinctes dans la vie du végétal.

Les éléments qui sont indispensables en fortes proportions sont ceux qui concourent, par les composés qu'ils forment, à l'édification des tissus. Pour cette raison, on leur a donné le nom d'*éléments plastiques*.

La plupart des corps que les premiers travaux d'analyse ont décelé dans la plante appartiennent à cette catégorie. Par exemple, l'hydrogène et l'oxygène qui, sous forme d'eau, constituent environ les 9/10 de la plante vivante ; le carbone, qui lié aux deux précédents, donne les composés ternaires si abondants dans le végétal : membrane cellulosique, substances de réserves telles que amidon, sucres, graisses, etc. ; l'azote qui, uni aux trois premiers, ainsi qu'à une petite quantité de soufre et parfois de phosphore, édifie les matières protéi-

ques, entre autres celles du protoplasme et du noyau. Le potassium, le sodium, le calcium, le magnésium, le chlore, le silicium semblent aussi le plus souvent pouvoir être rangés parmi les éléments plastiques.

La somme des poids de tous ces éléments représente, à moins de 1/1000 près, le poids total du végétal ; c'est dire que les autres corps simples dont nous avons signalé la présence dans la plante n'y sont contenus qu'en proportions extrêmement faibles. Pour cette raison, beaucoup de physiologistes n'ont voulu les considérer que comme des accidents dans la composition du végétal et leur ont dénié la propriété d'être des substances indispensables au même titre que les éléments plastiques. Des expériences synthétiques, conduites avec un soin tout particulier, ont permis d'attribuer — au moins à un certain nombre d'entre elles — le caractère d'élément nécessaire.

Le mérite d'avoir le premier mis nettement en évidence l'intervention de très petites quantités de matière dans la vie du végétal revient à Raulin. Dans la partie de son travail où il traite de l'influence du zinc sur la végétation de l'*Aspergillus niger*, cet auteur montre en effet que ce métal, à la dilution de 1/100.000, augmente encore sensiblement la récolte. Mais dans ces recherches, Raulin s'est occupé simplement d'établir le caractère d'utilité du zinc, sans s'attacher à prouver son rôle comme élément physiologique.

G. Bertrand et ses élèves ont repris cette question en la développant ; ils se sont proposés non seulement de démontrer l'influence de doses infinitésimales de métalloïdes et de métaux, mais encore de déterminer le mécanisme de leur action.

Ces expérimentateurs, grâce aux perfectionnements techniques apportés à leurs méthodes de travail, ont pu établir que la dilution à laquelle agissent certains corps est encore bien plus considérable que ne l'avait admis Raulin. C'est ainsi que Javillier est parvenu à mettre en évidence l'action du zinc sur l'*Aspergillus* à l'énorme dilution de 1/50.000.000 : le poids de récolte de 1 gr. 91 dans le témoin sans zinc atteint 2 gr. 53

par l'introduction de 5 millièmes de milligramme de zinc dans 250 cc. de liquide nutritif.

Les résultats obtenus avec le manganèse par G. Bertrand sont plus extraordinaires encore. Ce savant a montré l'influence de ce métal sur la végétation de l'*Aspergillus niger* à l'invraisemblable dilution de 1/10.000.000.000. Voici les chiffres d'une expérience :

POIDS SEC EN GRAMMES DES RÉCOLTES OBTENUES :

| Sans addition de Mn | Après addition de | | |
|---|---|---|---|
| | Un cent-millième de Mn | Un milliardième de Mn | Un décimilliardième de Mn |
| — | — | — | — |
| 0.68 | 1,69 | 1,30 | 1,11 |

Des faits aussi remarquables que ceux-ci ne permettent plus de nier l'intervention de très petites quantités de certains éléments dans la croissance des végétaux : il reste maintenant à expliquer leur mode d'action.

Sur ce point encore, le débat persiste et deux théories sont en présence.

Quelques auteurs refusent d'admettre que les corps agissant à si faibles doses appartiennent normalement à la constitution du végétal ; ils les considèrent comme des substances accidentelles et toxiques, capables de produire une excitation de la croissance lorsque leur concentration devient inférieure à celle qui détermine les effets nuisibles.

A cette *théorie de l'excitation toxique*, G. Bertrand oppose la *théorie physiologique* dont il appuie la démonstration en particulier sur deux arguments : l'un positif, en faveur de cette dernière théorie ; l'autre négatif, contre la première.

G. Bertrand a pu en effet, d'une part, établir d'une façon irréfutable le rôle physiologique et nécessaire d'un corps agissant à une extrême dilution : le manganèse.

D'autre part, il a montré que des substances nocives telles que l'argent, n'arrivent jamais à acquérir la propriété d'exciter la croissance des végétaux, même si on diminue assez leur concentration pour atteindre aux doses non toxiques : l'action défa-

vorable cesse simplement au-dessous d'une certaine limite sans qu'apparaisse jamais aucun rôle activant. Nous avons dit que l'influence nocive de l'argent sur l'*Aspergillus niger* se fait sentir jusqu'à la dilution de $M/10^6$ ; G. Bertrand a essayé toutes les doses plus faibles jusqu'à $M/10^{22}$ : toutes se sont montrées inactives.

Mais revenons à l'examen du premier fait, le plus intéressant, puisque c'est lui qui a apporté l'argument décisif à la théorie physiologique.

On sait l'importance considérable que présentent les phénomènes d'oxydation chez les êtres vivants. Or la fixation de l'oxygène dans les plantes se fait en particulier par l'intermédiaire d'une diastase qui a été découverte dans le latex de l'arbre à laque, d'où son nom de *laccase*, diastase qui existe d'une manière générale chez les végétaux Les travaux de G. Bertrand ont établi qu'on peut la considérer comme formée par l'union d'une matière organique particulière, à fonction acide très faible, avec une très petite quantité de manganèse. C'est le métal qui joue le rôle actif comme transporteur d'oxygène : en effet, l'activité des divers échantillons de laccase est proportionnelle à leur teneur en manganèse ; si l'on arrive à enlever cet élément, la diastase perd la propriété d'agir comme fixatrice d'oxygène.

L'expérience a montré que le manganèse intervient ici à la façon d'un catalyseur chimique. D'où le nom d'*éléments catalytiques* réservé aux corps dont l'analyse ne révèle que de faibles traces chez les êtres vivants et qui pourtant influent sur les phénomènes biologiques.

D'autres travaux sont venus à l'appui de la théorie physiologique. Je citerai ceux de deux collaborateurs de G. Bertrand : Javillier et Agulhon.

Le premier a prouvé que le zinc fait partie de la composition de l'*Aspergillus* et favorise son développement à la façon du manganèse ; il a montré aussi que ce métal est constamment présent chez les végétaux.

Agulhon a étudié au même point de vue le bore ; il a reconnu

et dosé ce métalloïde dans toutes les plantes qu'il a examinées et établi le rôle de cet élément dans la croissance des végétaux supérieurs.

Nous avons dit que les éléments plastiques et les éléments catalytiques doivent être considérés comme nécessaires à la vie de la plante. Au point de vue du mode d'action, il nous reste à examiner une troisième catégorie de corps qui sont peut-être simplement utiles : je veux parler des *éléments antitoxiques*.

Ces substances ont été surtout bien étudiées chez les animaux par Lœb. On connaît les expériences de cet auteur sur les œufs fécondés de *Fundulus* : ceux-ci ne se développent pas et meurent dans une solution de chlorure de sodium pure d'une concentration analogue à celle de l'eau de mer ; mais, si l'on ajoute à cette solution une certaine quantité d'un sel d'un métal bivalent, il se forme autant d'embryons que dans l'eau de mer normale. Cet effet n'est pas produit seulement par les sels des métaux bivalents contenus dans l'organisme comme le calcium, mais encore par des cations toxiques tels que le zinc. Inversement, les sels à cations monovalents jouent le rôle d'antitoxique vis-à-vis des sels à cations bivalents.

Lœb explique cette action en supposant que les sels de métaux bivalents diminuent la vitesse de diffusion des sels de métaux monovalents vers l'intérieur de l'œuf et réciproquement.

Lœb admet qu'il existe deux sortes de substances dans les solutions nutritives : les substances nutritives proprement dites et les substances protectrices. Parmi les premières, il cite $CO^2$, $NH^4$, $PO^4$, $SO^4$ et peut-être K ; parmi les deuxièmes, Na et Ca.

Ces résultats ont été étendus aux végétaux par Osterhout. Cet auteur a étudié l'action des constituants de l'eau de mer, non seulement sur les algues marines, mais encore sur les plantes terrestres. Il a montré que les sels expérimentés sont toxiques employés isolément, tandis que leur mélange est inoffensif et permet le développement du végétal. Il a donné à ces milieux de culture où les différents éléments viennent mutuellement neutraliser leur toxicité, le nom de « physiologically balanced

solutions » ce que nous traduirons par *solutions physiologiquement équilibrées*. Osterhout admet que certains liquides nutritifs sont suffisamment dilués pour que l'intervention de substances antitoxiques ne soit pas nécessaire.

Cette idée des solutions équilibrées a été reprise récemment sous une autre forme par Mazé. Cet auteur montre que le rendement d'une culture est réglé, non pas d'après la loi du minimum, — c'est-à-dire sur la substance alimentaire la moins abondante au point de vue des exigences de la plante, — mais d'après celle des *rapports physiologiques*. Or une solution nutritive obéissant à cette loi n'est autre chose qu'une solution équilibrée.

Tout ce que nous venons de dire sur les éléments antitoxiques semble bien prouver qu'ils sont simplement utiles à la plante en agissant sur le milieu : ils ne font pas partie de la constitution essentielle de la matière vivante, ils ne pénètrent même pas forcément dans le protoplasme et ils n'exercent leur action protectrice que dans des conditions bien déterminées.

Leur rôle n'en est pas moins important, car s'ils n'interviennent pas directement dans le fonctionnement de la vie végétale, ils permettent à certaines substances indispensables d'être utilisées, ce qui serait impossible sans leur présence.

Il nous reste une dernière question à examiner, celle du **remplacement des éléments chimiques** les uns par les autres dans les réactions vitales.

Les essais de substitution ont porté principalement sur des corps doués de propriétés voisines. C'est ainsi qu'on a comparé entre eux les différents métaux alcalins ; on est arrivé à montrer que chez les végétaux inférieurs, le rubidium peut dans une certaine mesure jouer le rôle du potassium. Parmi les alcalino-terreux, le baryum et le strontium arrivent à prendre la place du calcium dans des réactions diastasiques que nous étudierons plus loin en détail ; mais pour d'autres fonctions, ces trois métaux s'opposent au contraire. Dans la culture de l'*Aspergillus niger*, le zinc ne peut jamais être suppléé par le

cadmium qui pourtant a une certaine action sur le développement de la moisissure ; le glucinium reste toujours sans effet. Enfin, malgré la similitude de leurs propriétés, on n'est jamais parvenu à remplacer le manganèse par le fer dans les réactions biochimiques où ce métal intervient.

Il semble que l'on puisse essayer de tirer de ces données quelques renseignements sur le mécanisme de l'action des divers éléments dans les phénomènes vitaux :

Lorsque des corps possèdent la faculté de se remplacer mutuellement, on peut en conclure que leur rôle dans le métabolisme se rattache à des propriétés qu'ils possèdent en commun ; c'est donc parmi celles-ci qu'il faudra chercher l'origine de l'effet observé.

Si, au contraire, des éléments même très voisins ne peuvent se substituer l'un à l'autre, cela indique que la réaction qui est en jeu se rapporte à l'un des caractères différentiels des substances considérées.

Malheureusement, l'étude chimique des divers corps simples et de leurs composés n'est pas toujours assez avancée pour que de telles recherches, séduisantes en théorie, soient toujours possibles en pratique. Trop souvent, l'influence d'un élément dans le métabolisme est en relation avec des phénomènes très complexes qui correspondent à des réactions encore inconnues de la chimie ordinaire.

*
* *

L'étude des différents éléments qui jouent un rôle dans les phénomènes vitaux a été systématiquement entreprise au laboratoire de M. Gabriel Bertrand.

Nous connaissons les belles recherches de ce savant sur le rôle physiologique du *manganèse*.

En collaboration avec Medigreceanu, il a étudié la diffusion de ce corps dans le règne animal ; avec Sazerac, son action sur la fermentation acétique. Olaru a recherché l'influence de cet élément sur les bactéridies des légumineuses.

Nous avons déjà parlé des recherches de Javillier sur le *zinc*, de celles d'Agulhon sur le *bore*.

Guérithaut a publié quelques résultats sur la présence du *cuivre* chez les végétaux.

Le rôle du *potassium* et du *sodium* chez les animaux a été examiné par Gérard.

Enfin, on peut rattacher à ces travaux ceux de Wolff et de Sauton sur la fonction catalytique du *fer*.

M. Gabriel Bertrand a bien voulu me confier l'étude du *rôle du calcium chez les végétaux*.

J'ai apporté à cette tâche mes efforts les plus consciencieux et j'espère être parvenue ainsi à quelques résultats.

Je suis profondément reconnaissante à M. G. Bertrand de m'avoir proposé un sujet d'un intérêt aussi réel et d'une portée aussi générale. Je lui dois d'avoir bénéficié, grâce à ses excellents conseils, de sa méthode de travail si sûre et si précise. J'espère avoir acquis, sous sa direction, quelques qualités d'expérimentation qui me permettront de continuer, avec fruit, mes recherches.

## CHAPITRE PREMIER

# Exposé historique et critique du rôle physiologique du Calcium dans la végétation

La *méthode analytique* appliquée à l'étude du rôle du calcium chez les végétaux n'a pu donner que des indications sans grande valeur ; ce métal est en effet si répandu partout qu'on ne peut tirer aucune conclusion du fait de le trouver fixé, en quantités plus ou moins considérables, dans toutes les plantes s'étant développées sur un milieu naturel.

Par contre, la *méthode synthétique* a conduit à des résultats curieux, mais souvent contradictoires. On peut les résumer ainsi :

1° La plupart des auteurs admettent que le calcium est utile seulement au développement des plantes supérieures et que les végétaux inférieurs peuvent se passer de cet élément. Cette limitation du rôle du calcium, si elle est réelle, différencie ce corps au point de vue physiologique des substances telles que le phosphore, le soufre, le potassium, le magnésium qui sont nécessaires à tous les organismes.

2° Le mode d'action du calcium chez les plantes supérieures est encore très discuté ; on attribue à ce corps les fonctions les

plus diverses : certains le considèrent comme indispensable en tant que constituant du protoplasme, d'autres nient au contraire sa nécessité et ne veulent lui reconnaître qu'un rôle indirect et secondaire dans le métabolisme.

Une telle diversité de vues entre les différents expérimentateurs laisse le champ libre à de multiples investigations nouvelles. Nous nous en rendrons encore mieux compte en passant rapidement en revue les très nombreux travaux déjà parus sur la question qui nous occupe.

Pour les exposer, j'adopterai l'ordre de la classification botanique, puisque le calcium paraît se comporter différemment suivant les groupes végétaux.

## I. — Thallophytes.

### 1° *Champignons.*

Les premiers travaux sur la nutrition des champignons sont dus à Pasteur. Dans ses recherches sur la *fermentation alcoolique* (1), ce savant cultive la levure sur un milieu de composition définie renfermant pour 100 gr. d'eau, 10 gr. de sucre candi, 0 gr. 1 de tartrate d'ammonium et, comme matières minérales, 1 gr. de cendres de levure.

Mais ces expériences ne donnent aucun renseignement au point de vue de l'utilité du calcium ; en effet, les cendres de levure contiennent environ, à côté de 50 0/0 d'acide phosphorique, 40 0/0 de potasse et 8 0/0 de magnésie, seulement 2 0/0 de chaux. Rien n'indique si cette petite quantité de calcium est nécessaire ou non au végétal. On ne peut tirer aucune conclusion du fait de la présence de cet élément dans les cendres de la levure, car il peut s'agir là simplement d'une fixation passive du métal.

1. Pasteur. 1859, *Ann. Ch. et Ph.*, 3e série, t. LVIII, p. 323.

Le but de Pasteur dans ce travail était du reste de déterminer les conditions de végétation du champignon et non pas de discuter la valeur relative des divers éléments minéraux qu'il lui offrait.

Ad. Mayer (1) a repris à ce dernier point de vue l'étude de la *nutrition de la levure*. Au lieu d'employer comme matières minérales un mélange aussi complexe que des cendres végétales, il constitue un milieu artificiel à l'aide de sels minéraux bien déterminés. Il arrive ainsi à mettre en évidence la supériorité des sels de magnésium sur ceux de calcium. Il se demande même si ces derniers sont bien utiles à la vie de la plante qu'il cultive. Il indique que d'autres expériences sont nécessaires pour trancher cette question.

Pour avoir des renseignements plus précis sur les besoins des champignons en aliments minéraux, il faut consulter le travail de Raulin (2). Le milieu de culture dont cet auteur a établi la formule, après de multiples essais, présente la caractéristique remarquable de ne pas renfermer de calcium; il donne pourtant de belles récoltes du champignon étudié : l'*Aspergillus niger*. D'après ces recherches, le calcium ne paraît donc pas indispensable au développement de ce végétal.

Mais doit-on admettre ce résultat sans discussion ?

Nous avons vu combien il est malaisé de prouver avec certitude l'inutilité d'un élément. Raulin, le premier, a signalé cette difficulté et il ne s'aventure pas à donner comme définitive la liste des corps simples dont il a, par ses travaux, démontré le rôle dans la croissance de l'*Aspergillus*. Il suppose que l'amélioration des techniques peut faire apparaître l'action utile de substances considérées auparavant comme indifférentes. Au début de ses propres recherches, il avait ainsi méconnu le rôle du fer et celui du zinc ; plus tard, le perfectionnement de sa méthode de culture lui a permis d'établir la nécessité de ces deux corps. L'apparente inutilité du calcium est peut-être due à

1. Ad. Mayer, 1869. Heidelberg.
2. Raulin. 1870, *Thèse Paris*.

une cause analogue et le liquide de Raulin renferme peut-être suffisamment de ce métal, à titre d'impureté, pour qu'une addition volontaire de cet élément reste sans effet? Nous discuterons plus longuement ce point dans le chapitre III.

Il est possible de faire une autre supposition : les expériences de Raulin montrent que l'*Aspergillus* peut donner une récolte en l'absence de calcium — ou au moins en présence de très petites traces de ce métal —; n'arriverait-on pas à accroître le rendement en introduisant dans le milieu une quantité convenable d'un composé calcique? Raulin a étudié indirectement cette question de la façon suivante : après avoir constaté qu'avec un mélange déterminé de substances organiques et de sels minéraux, il obtient un certain poids de récolte, il tente de l'augmenter par une nouvelle addition d'éléments. Il essaye dans ce but quelques substances complexes — terre végétale, terre cuite pulvérisée, cendres de bois — qui toutes renferment du calcium; il voit que dans ces conditions le poids primitif de la récolte est multiplié par un facteur variant de 1,2 à 1,5. Quel est l'élément qui agit parmi tous ceux qui ont été introduits? Raulin suppose que c'est la silice, car en ajoutant au mélange primitif un silicate soluble, il constate que le poids de récolte est multiplié sensiblement par le même facteur (1,2-1,4). Raulin ne dit pas avoir essayé de la même façon que la silice les autres constituants des substances complexes ajoutées, les sels de calcium en particulier.

Enfin, on peut émettre une troisième hypothèse : le calcium inutile en présence de certains éléments peut devenir nécessaire, en se substituant à eux, si ces éléments viennent à manquer dans le milieu.

C'est ce qu'a prétendu Nægeli (1) qui a admis pour les champignons le remplacement réciproque de toutes les bases alcalino-terreuses; en particulier celui de la magnésie (qui représente l'élément alcalino-terreux dans le liquide de Raulin) par la chaux.

1. Nægeli. 1881, *Bot. Mittlg.*, t. III, p. 458.

Mais tous les auteurs qui après Nægeli ont abordé cette étude ont montré qu'il ne se produit aucun développement en l'absence de magnésium, qu'il y ait ou non du calcium dans le milieu.

C'est ainsi que Molisch (1), dans le but de combattre l'opinion de Nægeli, a établi, par des expériences conduites avec beaucoup de soin, l'absolue nécessité du magnésium pour les champignons et le non remplacement de cet élément par le calcium, le strontium, le baryum.

Benecke (2) qui a repris ces recherches est arrivé aux mêmes résultats que Molisch.

Ces deux auteurs n'ont pas conclu seulement à l'impossibilité de substituer le calcium au magnésium, ils ont également admis que le premier métal est inutile pour les champignons; ils obtiennent en effet, comme Raulin, de bonnes récoltes en l'absence de cet élément.

Antérieurement, Winogradsky (3) était parvenu au même résultat pour *Mycoderma vini*.

Wehmer (4), dans son étude sur la production de l'acide oxalique par l'*Aspergillus niger*, fait remarquer que le milieu de culture qu'il emploie ne renferme pas de calcium et que le champignon s'y développe pourtant d'une façon satisfaisante. Dans la partie de son travail où il traite de l'influence de l'addition de sels de calcium, il ne signale pas dans ces conditions d'amélioration de récolte.

On peut adresser à tous ces auteurs le même reproche; ils paraissent avoir ignoré complètement l'important travail de Raulin et ils ne mettent pas à profit, pour éclairer leurs propres recherches, les résultats obtenus par ce savant. De plus, ils négligent de vérifier par l'analyse chimique le degré de pureté

1. Molisch. 1894, *Bot. Centralbl*, t. LX, p. 167; *Sitzb. Akad. Wiss. Wien*, t. CIII, p. 554.

2. Benecke. 1894, *Bot. Centralbl.*, t. LX, p. 195; *Ber. d. bot. Gesellsch.*, t. XII, p. 105; 1895, *Jahrb. f. wiss. Bot.*, t. XXVIII, p. 487; 1896, *Bot. Zeitg.*, t. LIV, p. 97.

3. Winogradsky. 1884, *Bot. Centralbl.*, t. XX, p. 165.

4. Wehmer. 1891, *Bot. Zeitg.*, t. LIX, p. 233.

de leur milieu de culture ; il est donc impossible de savoir si, malgré les précautions prises, ils n'expérimentent pas, à leur insu, en présence de l'élément dont ils prétendent démontrer l'inutilité.

Lœw (1) s'est adressé à une méthode indirecte pour prouver la non nécessité du calcium chez les végétaux inférieurs. Devant la difficulté d'éliminer avec certitude cet élément, il se contente de l'insolubiliser par addition d'acide oxalique ou d'oxalate soluble : seuls les végétaux qui peuvent se passer de calcium doivent se développer dans ces conditions. Or tandis que les plantes supérieures meurent dans un liquide de culture renfermant de l'acide oxalique ou un oxalate soluble, les végétaux inférieurs, en particulier les levures et les moisissures, se développent parfaitement dans un tel milieu. Lœw en conclut donc que le calcium est nécessaire aux premières et est au contraire inutile aux seconds.

Mais il ne faut pas oublier que l'insolubilité de l'oxalate de calcium n'est pas absolue, surtout dans un milieu complexe pouvant renfermer des substances facilitant la dissolution du sel calcique. Le procédé utilisé par Lœw ne donne donc pas de résultats plus certains que les méthodes directes employées par les précédents auteurs.

Si la majorité des expérimentateurs admettent l'inutilité du calcium pour les champignons inférieurs, quelques-uns attribuent pourtant à ce métal un rôle favorisant vis-à-vis de ces végétaux.

C'est ainsi que d'après Duclaux (2), le *Penicillium glaucum* cultivé sur liquide de Raulin pousse mieux lorsqu'on ajoute au milieu de petites quantités d'un sel de calcium.

Osterhout (3) dénie au calcium la propriété d'être un aliment pour les champignons inférieurs, mais il prétend que dans certaines conditions de culture, — par exemple lorsque le

1. Lœw. 1892. *Flora*, t. L, p. 368 ; 1898. *Bot. Centralbl.*, t. LXXIV, p. 257.
2. Duclaux. 1898. *Tr. de microb.*, t. II, p. 4.
3. Osterhout. 1907. *Univ. of California. Publ. Bot*, t. II, p. 317.

milieu devient trop concentré —, ce métal peut devenir favorable à titre d'antitoxique.

Bokorny (1), dans un travail où il passe successivement en revue l'action d'une cinquantaine de corps sur le développement de la *levure* et d'autres champignons, montre que l'oxalate de potassium est inoffensif pour ces organismes ; pourtant, d'après lui, les sels de calcium paraissent avoir une action favorable ; Bokorny suppose que ces sels sont nécessaires à l'un des échanges de substance de la levure, mais qu'ils ne font pas partie intégrante du protoplasme.

Buromsky (2) attribue également un rôle utile au calcium dans le développement de l'*Aspergillus niger*, mais il introduit ce métal sous forme de sulfate et nous verrons dans le cours de ce travail comment il faut interpréter la légère augmentation de poids de récolte constatée dans ce cas. De plus, les conditions dans lesquelles opère cet auteur paraissent défectueuses : il obtient en effet une récolte en l'absence de magnésium, fait controuvé par la majorité des expérimentateurs.

Tous les résultats que je viens d'exposer se rapportent aux champignons inférieurs. Lœw admet, sans le démontrer, que les champignons supérieurs se comportent différemment et qu'ils ont besoin de calcium.

Hori et Weir ont abordé cette question expérimentalement. Ils utilisent la méthode indirecte préconisée par Lœw, c'est-à-dire qu'ils cultivent diverses espèces de champignons en présence d'oxalates solubles ; ils admettent que seules les espèces qui se développent dans ces conditions peuvent se passer de calcium.

Hori (3) emploie un bouillon naturel à base d'amidon, il ajoute soit 0,5 0/0 de sulfate de potassium, à titre de témoin, soit 0,5 0/0 d'oxalate de potassium. Tous les champignons se développent également bien dans le milieu primitif et dans

1. Bokorny. 1912. *Centr. f. Bakt. II*, t. XXXV, p. 118.
2. Buromsky. 1912. *Centr. f. Bakt. II*, t. XXXVI, p. 54.
3. Hori. 1910. *Flora*, t. CI, p 447.

celui additionné de sulfate ; mais en présence d'oxalate, les résultats sont les suivants :

*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium glaucum* donnent une belle récolte.

*Fusarium roseum*, *Rhizopus nigricans*, *Ramularia citri*, *Botrytis tenella*, *Sclerotinia Libertiana* ont une croissance très retardée.

*Cephalothecium roseum* et *Entomophtora* ne se développent absolument pas.

Weir (1) qui a effectué des recherches analogues sur différentes espèces du genre *Coprinus* trouve que l'oxalate neutre de potassium est toxique pour ces champignons et en conclut que le calcium leur est nécessaire

Si nous résumons les travaux parus sur le rôle du calcium chez les champignons, nous voyons donc que la plupart des auteurs admettent que cet élément est inutile aux formes inférieures, mais qu'il devient nécessaire à celles présentant une organisation plus compliquée.

### 2° *Algues*

Les travaux que nous allons examiner maintenant vont nous montrer que les conclusions formulées à propos des Champignons s'appliquent également au groupe des Algues.

Lœw (2) trouve que les oxalates solubles ne sont pas toxiques pour les algues inférieures tandis qu'ils le sont extrêmement pour les espèces plus différenciées. Il établit par cette méthode indirecte l'inutilité du calcium pour l'espèce *Palmella* et au contraire la nécessité de cet élément pour *Spirogyra*. Lœw a étudié tout particulièrement cette dernière algue et observé qu'en présence d'oxalate, il s'y produit des phénomènes de désorganisation du noyau et des corps chlorophylliens. Il a

1. Weir 1911. *Flora*, t. CIII, p. 87.
2. Lœw. 1895, *Bot. Centralbl.*, t. LXIII, p. 161 ; *id.*, t. LXIV, p. 433 ; 1898, *id.*, t. LXXIV, p. 257.

fait des constatations analogues sur *Vaucheria*, *Mougeotia*, *Zygnema*, *Cosmarium*, *Œdogonium*, *Chladophora*, *Sphæroplea*, etc. ; les *diatomées* sont également sensibles à l'action des oxalates.

Molisch (1), étudiant la nutrition minérale des algues, trouve que tandis que *Microthamnion*, *Stichococcus*, *Ulothrix*, *Protococcus* se développent sur les milieux sans calcium, *Vaucheria* et *Spirogyra* ont absolument besoin de cet élément. Chez ces deux dernières espèces d'algues, le calcium peut pourtant être partiellement remplacé par le strontium.

Bokorny (2) cultive des *Spirogyres*, des *Zygnémacées*, des *Rhizocarpées*, sur une solution privée soit de calcium, soit de magnésium, soit des deux éléments à la fois. Dans le cas où il n'y a pas de calcium, il constate une diminution de l'appareil chlorophyllien accompagnée d'un ratatinement des noyaux.

D'après Benecke (3), les genres *Hormidium* et *Chlamydomonas* n'ont pas besoin de calcium, mais le magnésium leur est indispensable.

Cet auteur a établi (4) que chez *Spirogyra* le calcium joue vis-à-vis des autres sels nutritifs un rôle antitoxique analogue à celui que nous étudierons plus loin à propos des végétaux supérieurs.

Osterhout (5) est parvenu à des conclusions semblables pour *Vaucheria* et plusieurs algues marines.

Enfin, la nécessité du calcium pour les diatomées *Nitzschia Palea* et *Navicula minuscula* a été mise en évidence par Richter (6).

Cette façon différente de se comporter des diverses algues est très intéressante à considérer.

1. Molisch. 1895, *Sitzb. Akad. Wiss. Wien*, t. CIV, I, p. 799 ; 1896, *Bot. Centralbl.*, t. LXVIII, p. 146.
2. Bokorny. 1895, *Bot. Centralbl.*, t. LXII, p. 1.
3. Benecke. 1893, *Bot. Zeitg.*, t. LVI, p. 83.
4. Benecke. 1907, *Ber. d. deut. bot. Ges.*, t. XXV, p. 322.
5. Osterhout. 1906, *J. Biol. Chem.*, t. I, p. 363.
6. Richter. 1906, *Sitzb. Akad. Wiss. Wien*, t. CXV, p. 49.

Nous voyons en effet que parmi les Algues vertes, les unes ont besoin de calcium, les autres semblent pouvoir se passer de cet élément. Ceci enlève de la valeur à la théorie qui voudrait attribuer au calcium un rôle dans la formation de la chlorophylle.

Lœw émet l'hypothèse que le besoin de calcium chez les algues est en relation avec le mode de reproduction. On sait que les algues peuvent se multiplier soit par simple bipartition, soit par zoospores, soit par œufs ; dans ce dernier cas, il y a lieu de distinguer entre l'isogamie et l'hétérogamie. Tous ces divers modes de reproduction correspondent, d'après Lœw, à une différentiation croissante du noyau ; le calcium serait nécessaire seulement aux formes possédant un noyau de constitution complexe.

Il est intéressant de rappeler ici que certaines algues, telles que *Phacotus*, *Codium*, *Halimeda*, *Cymopodia*, *Corallina* présentent la curieuse propriété d'incruster leurs tissus de calcaires. Il en est de même dans un groupe voisin des algues, les Characées, pour le genre *Chara*. On ignore encore le mécanisme de cette fixation de carbonate de calcium. Pringsheim (1) tente de l'expliquer en supposant que par suite de l'assimilation par la plante de l'anhydride carbonique dissous, le bicarbonate se transforme en carbonate qui se dépose dans les tissus du végétal. Mais cette hypothèse ne rend pas compte du fait que des espèces voisines, croissant dans le même milieu, se comportent différemment à l'égard de cette fixation de calcaire.

Enfin Fischer (2) a observé des cristaux de sulfate de calcium chez beaucoup de *Desmidiées*.

Dans l'exposé des travaux relatifs aux Algues, il nous faut faire une place à part à l'important groupe des *Bactéries* (3).

Beaucoup de liquides nutritifs synthétiques préconisés pour la culture de diverses espèces microbiennes ne renferment pas

1. Pringsheim. 1886. *Jahrb. f. wiss. Bot*, t. XIX, p. 138.
2. Fischer. 1883, *Jahrb. f. wiss. Bot.*, t. XIV, p. 133.
3. La place des Bactéries dans la classification est encore très discutée ; certains auteurs (Bonnier et Leclerc du Sablon) en font maintenant un groupe à part qu'ils rapprochent des Champignons.

de calcium ; je citerai par exemple le milieu Gessard pour le *bacille pyocyanique*, celui de Frænkel pour le *colibacille*, celui de Péré pour le *coli* et le *typhique*, celui de Proskauer et Beck pour le *tuberculeux*, etc. Mais les exigences alimentaires des bactéries sont si faibles qu'on peut craindre que le milieu qu'on leur offre renferme toujours, à l'état d'impureté, suffisamment de calcium pour subvenir à leur besoin en cet élément. Il faut, pour ces recherches sur la nutrition des bactéries, opérer sur des milieux purifiés avec un soin tout particulier.

Sauton (1) a entrepris dans ces conditions l'étude systématique de la nutrition minérale du *bacille tuberculeux*. Il a établi la grande importance du magnésium et du potassium pour cet organisme et l'inutilité du calcium. La présence de quantités appréciables de ce dernier élément dans les cendres du bacille tuberculeux, signalée par Schweinitz et Dorsett (2), doit donc être considérée comme accidentelle.

Certaines maladies des végétaux semblent aggravées par la présence de calcium. C'est ainsi que Laurent (3) signale que *Bacillus coli communis* et *Bacillus fluorescens putridus* peuvent attaquer la pomme de terre après un fort chaulage ; mais il doit s'agir là, non pas d'une augmentation de la vitalité des microbes, mais d'une diminution de résistance de la plante.

Une question, qui par son importance au point de vue de l'agriculture a suscité de très nombreux travaux, est celle de l'influence des composés calciques sur le développement des *bactéries du sol*.

Déjà Pichard (4) en 1884 signale l'action favorisante du sulfate et du carbonate de calcium sur la nitrification.

Dehérain (5) nie l'influence du sulfate de calcium, mais il reconnaît le bon effet des amendements calcaires sur le dévelop-

1. Sauton. 1912, *C. R. Ac. Sc.*, t. CXV, p. 860.
2. Schweinitz et Dorsett. 1898. *Centralbl. f. Bakt. I.*, t. XXIII, p. 993.
3. Laurent. 1899, *Ann. Inst. Past.*, t. XIII, p. 1.
4. Pichard. 1884, *C. R. Ac. Sc.*, t. XCVIII, p. 1289 ; 1889, *C. R. Ac. Sc.*, t. CIX, p. 445 ; 1891, *C. R. Ac. Sc.*, t. CXII, p. 1455.
5. Dehérain. 1902, *Tr. de Ch. Agric.*, 2e éd., p. 661 et 647.

pement des bactéries nitrifiantes ; il l'explique en admettant que la nitrification ne s'établit que sur des sols légèrement alcalins : la chaux, d'abord nuisible, devient favorable en se carbonatant à l'air.

Dehérain et Demoussy (1) trouvent que les bactéridies de certaines Légumineuses, telles que la luzerne, la vesce, le trèfle, existent dans les milieux acides (terre de bruyère), mais pullulent seulement dans les sols calcaires.

Marchal (2), étudiant l'influence des sels minéraux sur la production des nodosités chez le pois, indique que les sels de calcium et de magnésium favorisent très nettement chez ce végétal la production des tubercules radiculaires.

D'après Fischer (3), la chaux agit favorablement sur la multiplication d'*Azobacter* et sur celle des autres bactéries du sol. Une addition de 0,1 à 0,3 0/0 de chaux vive diminue d'abord le nombre des bactéries, mais quelque temps après l'augmente. Une quantité équivalente de carbonate de calcium produit dès le début une action favorisante.

Engberding (4) signale aussi une petite augmentation du nombre des bactéries du sol après addition de 0,1 0/0 de chaux vive.

Tout récemment cette question a été reprise par Miller (5) ; les conclusions formulées par cet auteur ne diffèrent pas de celles établies par les autres chimistes agricoles.

Fischer attribue l'heureuse influence des composés calciques sur le développement des bactéries du sol à une action excitante spécifique du métal. Il semble plus plausible d'admettre l'opinion de Dehérain et de voir seulement dans ce phénomène le résultat de la modification de la réaction du sol déterminée par les amendements calcaires. Ceux-ci exercent en effet leur action favorable surtout en terrains acides.

1. Dehérain et Demoussy. 1901, *C. R. Ac. Sc.*, t. CXXXIII, p. 1174 ; 1902, *C. R. Ac. Sc.*, t. CXXXIV, p. 75.

2. Marchal. 1901, *C. R. Ac. Sc.*, t. CXXXIII, p. 1032.

3. Fischer. 1905, *Centr. f. Bakt. II*, t. XIV, p. 33 ; 1906, *Centr. f. Bakt. II*, t. XV, p. 235 ; 1909, *Landw. Vers. Stat.*, t. LXX, p. 335.

4. Engberding. 1909, *Centralbl. f. Bakt. II*, t. LIII, p. 635

5. Miller. 1914, *Zeitschr. f. Gärungsphysiol.*, t. IV, p. 194.

## II. — Muscinées.

Peu de recherches systématiques sur ce groupe de plantes.

L'étude de la répartition des végétaux suivant la nature du sol nous apprend que certaines espèces de mousses recherchent le calcaire, c'est-à-dire sont calcicoles ; d'autres au contraire vivent de préférence sur les terrains siliceux, c'est-à-dire sont calcifuges. Parmi ces dernières, on signale en particulier les *Sphaignes* qui meurent si une source calcaire vient déverser ses eaux à l'endroit où elles se développent.

P. Becquerel (1) et plus récemment Servettaz (2) ont cherché à étudier avec quelque précision les conditions de culture des mousses.

Ces deux expérimentateurs se sont proposé de cultiver des mousses en milieu liquide stérile. En possession de cette technique, ils ont essayé de déterminer l'influence d'un certain nombre de facteurs sur le développement de ces plantes. Ils ont examiné en particulier le rôle des divers constituants du liquide nutritif.

P. Becquerel a expérimenté sur *Atrichum undulatum* et *Hypnum velutinum ;* il admet que ces deux espèces peuvent se passer de calcium, ou qu'au moins chez ces végétaux le potassium peut remplacer le calcium.

Servettaz a repris cette étude sur *Hypnum purum*. Au point de vue du rôle du calcium, il arrive à la conclusion que cette mousse peut vivre un certain temps avec de très petites quantités de calcium, mais qu'elle ne saurait cependant s'en dispenser totalement.

## III. — Cryptogames vasculaires.

Ces végétaux, proches parents des Phanérogames, ne semblent pas avoir des exigences différentes au point de vue ali-

1. P. Becquerel. 1904, *C. R. Ac. Sc.*, t CXXXIX, p. 745 ; 1906, *Rev. gén. de Bot.*, t. XVIII, p. 49.

2. Servettaz 1913, *Ann. des Sc. nat. Bot.*, 9e série, t. XVII, p. 111.

mentaire. Nous pouvons admettre que tout ce que nous dirons à propos des Phanérogames s'applique aussi bien au groupe des Cryptogames vasculaires.

Certaines fougères, *Pteris aquilina* entre autres, paraissent se développer de préférence sur les terrains siliceux. Masclef (1) a pourtant signalé que l'on peut rencontrer *Pteris aquilina* sur les sols calcaires. Ce végétal présente alors un aspect particulier que l'auteur explique comme étant le résultat d'une adaptation au milieu ; mais il paraît plus plausible d'attribuer cette modification de forme à la toxicité du substratum.

On trouve dans les fougères des composés du calcium comme dans les Phanérogames.

Hansen (2) a étudié chez *Angiopteris evecta* et *Marattia cicutæfolia* la cristallisation artificielle du sulfate de calcium.

Belzung et Poirault (3) ont signalé chez *Angiopteris evecta* la présence de malate neutre de calcium.

## IV. — Phanérogames.

Ce groupe, de par son importance, est celui qui a suscité le plus grand nombre de travaux. L'intérêt théorique qui s'attache à l'étude de la nutrition chez tous les végétaux, à quelque embranchement qu'ils appartiennent, se double ici de l'intérêt pratique considérable qui peut résulter de telles recherches au point de vue de l'agriculture.

On sait que la coutume d'améliorer les terres par l'emploi d'*amendements calcaires* est extrêmement ancienne. Cette addition de calcaire est surtout efficace sur les terres granitiques, schisteuses ou tourbeuses. Certains pays, tels que le Limousin, ont été absolument transformés par l'introduction de cette pratique dans la culture.

L'épandage de la chaux n'a pas seulement pour but d'appor-

1. Masclef. 1892, *Rev. gén. de Bot.*, t. IV, p. 7.
2. Hansen. 1889, *Arb. d. bot. Institut zu Würzburg*, t. III.
3. Belzung et Poirault. 1892, *Journ. de Bot.*, t. VI, p. 286.

ter aux plantes un aliment, elle agit surtout en modifiant les propriétés physiques du sol.

Voici du reste comment Dehérain (1) résume les effets attribués aux amendements calcaires :

« Les amendements calcaires sont employés sous forme de « marne, de chaux, de tangue ou de résidus industriels. « .... Les plantes de grande culture ne s'assimilent que de « faibles quantités de chaux ; celles qu'on a reconnu avanta- « geux de répandre sont tellement supérieures aux exigences « des récoltes, qu'on a été conduit à chercher comment les « amendements calcaires agissent sur le sol, et on a vu :

« Qu'en coagulant l'argile des terres fortes, ils empêchent « leur effondrement sous l'influence de la pluie ; ces terres ne « se transforment plus en boues imperméables et restent « abordables aux instruments même pendant les arrières-sai- « sons humides.

« Que les amendements calcaires et notamment la chaux « attaquent les matières azotées de la terre arable et y provo- « quent la formation d'une petite quantité d'ammoniaque. Au « début de son application, la chaux retarde la nitrification en « créant dans le sol un milieu trop alcalin pour que le ferment « nitrique puisse y vivre ; bientôt cependant la chaux se car- « bonate, elle est alors comme la marne ou la tangue absolu- « ment favorable à la nitrification ; la présence d'une base « salifiable étant nécessaire pour saturer l'acide nitrique à « mesure qu'il se produit.

« Que les sels de chaux déterminent la précipitation incom- « plète des matières noires du fumier, les préservent ainsi de « la déperdition dans les terres légères ; la dissolution organi- « que calcaire qui persiste après cette précipitation paraît être « très favorable au développement d'un grand nombre d'es- « pèces, surtout dans le jeune âge.

« Les amendements calcaires agissent sur les phosphates de « sesquioxyde qui se forment spontanément dans la terre

1. Dehérain. 1902, *Tr. Ch. agr.*, 2e éd., p. 654.

« arable. Ils les décomposent et ramènent l'acide phosphori-
« que à un état plus favorable à l'assimilation.

« Enfin, en introduisant dans le sol de la chaux, on le rend
« apte à porter certaines espèces pour lesquelles la chaux est
« un aliment nécessaire, on donne à ces espèces un avantage
« dans la lutte pour la vie qu'elles engagent contre celles qui
« couvraient le sol ; ces dernières se trouvent au contraire dans
« des conditions moins avantageuses et finissent par dispa-
« raître ; la transformation de la flore est un des effets les plus
« marqués du chaulage.

« Toutefois si la chaux exerce ainsi des effets très favorables,
« elle présente cet inconvénient d'être fatale à des espèces
« végétales utiles : châtaigniers, lupins jaunes ; en outre en dis-
« solvant l'humus attaquable, elle semble le faire disparaître
« assez rapidement pour laisser, après quelques années les
« terres chaulées et non fumées, dans un état d'épuisement qui
« ne se répare que lentement.

« A côté de ces inconvénients, les avantages sont tels qu'on
« peut dire que l'épandage très ancien de la marne, plus
« récent de la chaux, ont largement favorisé, parfois créé la
« prospérité agricole. »

Depuis un siècle environ, le *plâtre* est utilisé en agriculture. On connaît l'expérience célèbre de Franklin destinée à attirer l'attention sur les bons effets du sulfate de calcium.

Comment expliquer l'action favorisante de ce corps ? Nous avons vu que Pichard lui fait jouer un rôle comme activant de la nitrification, mais Dehérain remarque que le plâtre réussit surtout aux légumineuses et n'exerce aucune action sur les céréales, ce qui paraît en contradiction avec l'opinion que le sulfate de calcium agit seulement sur la production des nitrates.

Dehérain (1) propose l'explication suivante :

« Le plâtre métamorphose en sulfate le carbonate de potasse
« immobilisé par les propriétés absorbantes de la terre ; ce sul-
« fate de potasse décompose l'humate de chaux et le transforme

1. Dehérain. 1902, *Tr. Ch. agric.*, 2e éd., p. 666.

« en humate de potasse dont se saisissent les racines des légu-
« mineuses. »

Dehérain indique qu'une addition de sulfate de potassium produit les mêmes effets qu'une addition de sulfate de calcium : c'est donc le radical $SO^4$ qui joue le rôle utile et non le métal calcium.

Le fait que les agriculteurs ajoutent à leurs terres pour les fertiliser des composés calciques ne nous apprend donc pas si le calcium est un aliment nécessaire pour la plante, puisque la chaux paraît agir surtout en modifiant les propriétés physiques du sol, le plâtre par le soufre qu'il introduit et non par le calcium.

Seules des expériences en milieu synthétique pourront nous renseigner au sujet du rôle du calcium comme aliment des plantes supérieures.

Les travaux parus sur le rôle du calcium dans la nutrition des plantes supérieures sont extrêmement nombreux. Pour les exposer, j'adopterai l'ordre suivant :

Je résumerai d'abord brièvement les connaissances que nous possédons sur la *répartition du calcium* dans les différents organes du végétal et la *forme* sous laquelle ce métal y existe.

Puis j'analyserai les travaux effectués dans le but de démontrer la *nécessité*, ou au moins l'*utilité* du calcium pour le développement des plantes vertes.

Je parlerai ensuite plus longuement de ceux se rapportant à l'étude du *mode d'action* de ce métal. Je considérerai le calcium au point de vue des rôles *plastique*, *catalytique* ou *antitoxique* qu'il peut jouer dans la végétation. J'étudierai aussi sa *toxicité*.

Enfin, je dirai quelques mots sur la *possibilité de remplacement* du calcium par d'autres éléments, le strontium en particulier.

Dans la plupart des traités de physiologie végétale ou de chimie agricole, on trouve tous les renseignements analytiques désirables sur la *répartition* des principaux éléments minéraux

dans les plantes. Je me contenterai de résumer ici brièvement les résultats les plus intéressants se rapportant au calcium (1).

Les cendres des *graines* de la majorité des végétaux présentent la particularité d'être pauvres en calcium et de renfermer au contraire une proportion assez notable de magnésium. On y trouve environ de 3 à 7 0/0 de chaux pour 10 à 15 0/0 de magnésie. Les graines de quelques rares espèces, telles que celles de moutarde, de betterave, de pavot ou de chanvre, contiennent pourtant plus de chaux que de magnésie, mais on peut les considérer comme des exceptions.

La teneur de la *racine* en matières minérales ne présente pas un intérêt bien grand, puisque cette partie du végétal constitue un organe de passage que les matières salines ne font le plus souvent que traverser; pourtant la racine peut fixer des quantités assez notables de chaux variant de 30 à 40 0/0 du poids des cendres.

Les *organes de réserves souterrains*, tels que les tubercules, les bulbes, les racines charnues, renferment des proportions de calcium variables, mais contrairement à ce qui existe chez les graines, le poids de chaux y est en général plus élevé que celui de magnésie.

Dans les *tiges herbacées*, la teneur en calcium augmente à mesure que la plante vieillit.

Le *bois* renferme le plus souvent des quantités très notables de chaux; parmi les arbres dont le bois est tout particulièrement riche en cette base, on peut citer : l'orme (77 0/0 du poids des cendres), le sorbier (76,1 0/0), le tilleul (75,9 0/0), le peuplier (66 0/0), le frêne (62 0/0). Du reste, pour une même espèce, la teneur en chaux varie avec la nature du sol sur lequel s'est développé le végétal ; c'est ainsi qu'on peut trouver dans les cendres du pin sylvestre de 41 à 62 0/0 de chaux; dans le hêtre, de 26 à 33 0/0 ; dans le bouleau, de 19 à 45 0/0 ; dans le chêne, de 19 à 27 0/0.

1. La plupart des indications données ici sont tirées principalement des articles de Lœw (1892-1912) et des traités de *Chimie agricole* de Dehérain (1902) et d'André (1909).

L'*écorce* est encore plus riche en chaux que le bois. La proportion de cette base augmente avec l'âge de l'écorce : formant au début jusqu'à 40 0/0 du poids des cendres, elle peut, dans les écorces âgées, en constituer souvent plus des trois quarts.

Les *feuilles* sont, avec les graines, les organes des végétaux les plus intéressants à étudier, car les phénomènes chimiques qui s'y accomplissent sont des plus importants ; l'étude de la répartition des matières minérales peut sans doute donner à ce sujet quelques indications intéressantes. Cette étude nous apprend que les feuilles s'opposent aux graines par leur richesse relative en calcium et au contraire leur faible teneur en magnésium. La proportion de calcium augmente avec l'âge de la feuille ; c'est ainsi que dans les feuilles de robinier, la teneur des cendres en chaux, de 20 0/0 en mai, s'élève à 72 0/0 en septembre. Les feuilles des Légumineuses, des Crucifères, des Crassulacées, etc., emmagasinent ainsi des quantités considérables de chaux. Les feuilles des Graminées et des Cypéracées sont au contraire moins riches en cette substance ; chez ces végétaux l'accumulation de chaux semble être remplacée par celle de la silice : il paraît exister une sorte de suppléance entre ces deux corps. Mais même dans ce cas, la proportion de chaux reste supérieure à celle de magnésie ; c'est ainsi que dans les cendres des feuilles de Graminées, on trouve en moyenne 7 0/0 de chaux et 3 0/0 seulement de magnésie.

Au point de vue de la quantité de substance minérale soutirée au substratum, on a constaté que plus le développement foliaire est grand, plus la consommation de chaux est considérable. Une récolte normale de blé en absorbe par hectare environ 11 kgr. 6 ; de betterave, 30 kgr. 2 ; d'herbe, 49 kgr. 4 ; de trèfle, 118 kgr. 8 ; de tabac, 153 kgr. 7. Un hectare de forêt consomme annuellement environ 20 kgr. de chaux.

Les *feuilles albinos* présentent l'intéressante particularité d'être moins riches en chaux que les feuilles vertes existant sur la même plante. Ceci a été mis en évidence en particu-

lier par les recherches de Weber (1), de Church (2), de Palladin (3), etc. Nous verrons plus loin les conclusions que certains auteurs ont cru pouvoir tirer de ce fait.

Si l'on considère la teneur en calcium de la *plante totale*, on voit qu'elle varie à la fois avec la composition chimique du sol et la nature du végétal. Malaguti et Durocher (4) arrivent à ce sujet aux résultats suivants : « Les plantes de la même espèce « renferment au moins une fois et demie autant de chaux « quand elles ont crû sur des terrains calcaires, que si elles « ont été cueillies sur des sols argileux, et l'on peut observer « d'ailleurs que les variations de richesse en chaux, suivant les « familles, marchent parallèlement dans les deux séries ».

Voici quelques chiffres, tirés du travail de ces auteurs, donnant les proportions centésimales de chaux dans les cendres des mêmes plantes cueillies sur des sols de nature différente :

| | | Sol calcaire | Sol non calcaire |
|---|---|---|---|
| Crucifères | *Brassica oleracea* . . . | 27,98 | 13,62 |
| | — *napus* . . . . | 43.60 | 19.48 |
| Légumineuses | *Trifolium pratense* . . . | 43,32 | 29,72 |
| | — *incarnatum* . | 36,18 | 26.68 |
| Dipsacées . . . | *Scabiosa arvensis* . . . | 28,60 | 17,16 |
| Liliacées. . . . | *Allium porrum* . . . . | 22,60 | 11,41 |
| Graminées . . . | *Dactylis glomerata*. . . | 6,24 | 4,62 |
| Amentacées. . . | *Quercus pedunculata* . . | 70.14 | 54 |
| | Moyenne. . . . . | 34,83 | 22,09 |

D'une façon générale aussi, on peut dire que contrairement à ce qui se passe pour le phosphore et le potassium, la proportion de calcium fixé augmente avec l'*âge* du végétal.

Cet exposé rapide de la répartition du calcium chez les végétaux suffit pour nous montrer que ce métal se rencontre dans toutes les parties de la plante, en quantités souvent très élevées.

1. Weber. 1875, *Landw. Vers. Stat.*, t. XVIII, p. 18.

2. Church. 1879, *Journ. Ch. Soc.*, t. XXXV, p 33 ; 1886, *Journ. Ch. Soc.*, t. XLIX, p. 839.

3. Palladin. 1891, *Ber. d. Deut. bot. Ges*, t. IX, p. 230 ; 1892, *Ber. d. Deut. bot. Ges.*, t. X, p. 179.

4. Malaguti et Durocher. 1856. *C. R. Ac Sc.*, t. XLIII, p. 384 ; 1858, *Ann. Ch. Ph*, 3e série, t. LIV, p. 257.

Sous quelle *forme* ce calcium existe-t-il dans le végétal?

Cette question a fait le sujet de nombreux travaux. Sans entrer dans des détails qui allongeraient inutilement cet exposé, on peut résumer ainsi les résultats obtenus :

Le calcium est renfermé dans la plante, soit à l'état de *sels solubles* : nitrate, phosphate, sulfate, malate, tartrate, etc. ; soit à l'état de *précipité* : carbonate, sulfate, oxalate, pectate, etc. Ce métal existe peut-être aussi dans le protoplasme sous forme de *composés organiques* autres que des sels. La présence de tels composés organiques a été admise en particulier par Loew, comme nous le verrons plus loin, et par Hansen (1). Ce dernier suppose que le phosphate de calcium qui précipite quand on traite les tissus végétaux par l'alcool doit être uni normalement à l'albumine et à la globuline du protoplasme.

Les deux formes qui, par la fréquence de leur présence dans les tissus végétaux, ont le plus retenu l'attention des chercheurs, sont celles de *carbonate* et d'*oxalate*. Payen (2) en 1846 a publié un intéressant mémoire sur « les concrétions et incrustations minérales dans les végétaux ». Il y étudie les dépôts de carbonate et d'oxalate de calcium que l'on rencontre, les premiers surtout chez certaines espèces (cystolithes des feuilles de figuier, poils et concrétions calcaires des Urticacées, etc.), les seconds, à peu près dans toutes les plantes ; il examine les conditions de formation de ces dépôts. Kohl (3) plus tard a repris, après beaucoup d'autres, cette question ; il décrit en particulier les différents aspects sous lesquels on rencontre l'oxalate de calcium dans le végétal.

Toutes ces notions sont à présent classiques, je ne m'y étends donc pas. On trouvera du reste dans les renseignements bibliographiques réunis à la fin de cet ouvrage, l'indication d'assez nombreux mémoires sur ce sujet.

La question qui nous intéresse surtout étant celle du *rôle*

1. Hansen. 1889. *Flora*, t. XLVII, p. 408.
2. Payen. 1846, *Mém. Ac. Sc. Sav. étr.*, t. IX, p. 77.
3. Kohl. 1889, Marburg.

*physiologique* du calcium dans la plante, nous allons analyser maintenant avec plus de détails les travaux s'y rapportant.

La présence constante du calcium chez les végétaux supérieurs permet-elle de conclure de façon certaine à la nécessité de cet élément pour la vie de la plante ? Tout ce que nous savons à cet égard nous incite à répondre par la négative. Les résultats donnés par les recherches analytiques suggèrent l'idée que la richesse des plantes en calcium semble surtout le fait d'une accumulation passive des sels de ce métal, accumulation d'autant plus abondante que la plante avance en âge. Seules, les recherches synthétiques peuvent nous renseigner sur l'importance du calcium en tant qu'élément physiologique.

Les premiers chimistes agricoles qui se sont préoccupés de l'alimentation minérale des plantes ont admis que le calcium comptait parmi les substances nutritives essentielles des végétaux. Tous les milieux de culture artificiels qu'ils ont expérimentés renferment cet élément ; les solutions devenues classiques, celles de Knop ou Detmer par exemple, en contiennent.

Je n'analyserai pas tous ces travaux qui prouvent plus ou moins directement le besoin de calcium du végétal ; je m'en tiendrai à ceux ayant uniquement pour but de démontrer les bons effets de l'élément calcium seul, quel que soit l'acide auquel ce métal est uni. Les premières recherches ont porté en effet principalement sur le phosphate de chaux, et les expérimentateurs attribuaient encore plus au phosphore qu'au calcium l'heureuse influence de ce sel dans la végétation. C'est dans cet esprit qu'ont été effectués par exemple les travaux de de Saussure (1) et ceux de Boussingault (2).

Je citerai pourtant une intéressante expérience de Lassaigne (3) dans laquelle le phosphate de calcium semble avoir été considéré surtout en tant que composé calcique.

1 De Saussure. 1804, *Rech. chim.*, etc.

2. Boussingault. 1860, *Agron. Ch. agr. Phys.*, t. I, p. 236.

3. Lassaigne. 1849, *C. R. Ac. Sc.*, t. XXVIII, p. 73 ; *Ann. Ph. Ch.*, 3e série, t. XXV, p. 346.

Lassaigne étudie « le mode de transport des phosphates et « carbonates de chaux dans les organes des plantes et l'in- « fluence qu'exercent ces sels calcaires dans l'acte de la ger- « mination et de la végétation ». Il observe que « les sels cal- « caires qui entrent dans la composition des os des animaux « peuvent être en partie dissous par les eaux pluviales et en « raison de la proportion d'acide carbonique que celles-ci « tiennent en solution ». Cette dissolution de sels calcaires agit favorablement sur la végétation. Lassaigne le démontre de la façon suivante : il met germer des grains de *blé* dans du sable lavé avec soin à l'acide chlorhydrique et arrosé, soit avec de l'eau distillée saturée d'acide carbonique, soit avec la dissolution des sels calcaires des os.

Dans le premier cas, la hauteur moyenne des tiges est de 6 cm. 5 à 7 cm.; dans le second de 8 à 10 cm.

Les poids secs correspondants sont de 0 gr. 153 et 0 gr. 193.

Après Lassaigne, de nombreux auteurs ont comparé le développement des végétaux suivant que le milieu renferme ou non du calcium.

C'est ainsi que Stohmann (1) cultive des pousses de *maïs* dans une solution nutritive sans calcium ; le développement cesse graduellement avec la consommation de la réserve de chaux. Après cinq semaines, arrêt de la végétation. Une addition de nitrate de calcium la fait reprendre immédiatement ; on note déjà, au bout de cinq heures, l'apparition de nouvelles pousses issues des bourgeons.

Bœhm (2) se demande quelles sont les matières minérales nécessaires à la jeune plante qui vit encore aux dépens des réserves contenues dans la graine. Il observe que les plantules de *Phaseolus multiflorus* meurent dans l'eau distillée, toujours avant d'être parvenues à vider leurs cotylédons, tandis qu'elles se développent parfaitement dans l'eau de fontaine ou encore en présence de solutions salines appropriées. Bœhm attribue à

1. Stohmann. 1862, *Ann. Chem. Pharm.*, t. CXXI, p. 285.
2. Bœhm. 1875, *Sitzb. Akad. Wiss. Wien*, t. LXXXI, p. 287.

la chaux que contiennent ces liquides le bon développement des graines. Il obtient en effet des plantes comparables, soit en présence de nitrate de calcium à 0,5 0/00, soit dans la solution nutritive complète. Nous reviendrons sur les travaux de cet auteur à propos du mode d'action du calcium.

Raumer et Kellermann (1) qui ont repris les expériences de Bœhm arrivent à des conclusions analogues.

Liebenberg (2) reproche à Bœhm de n'avoir expérimenté que sur une espèce végétale ; il reprend donc l'étude de l'influence des sels de calcium sur la germination en s'adressant à différentes graines. Il cherche à établir quelles sont les substances nutritives qui doivent être fournies à la jeune plante pour que celle-ci parvienne à utiliser complètement les réserves de sa graine. Pour arriver à ce résultat, il constate que :

1° la chaux est absolument nécessaire aux espèces suivantes : *Phaseolus multiflorus*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Vicia sativa*, *Ervum lens*, *Ervum Ervilia*, *Medicago sativa*, *Ricinus africanus*, *Soja hispida*, *Cucurbita Pepo*, *Cucumis sativus*, *Brassica oleracea*, *Cannabis sativa*, *Helianthus annuus*, *Zea Maïs* ;

2° elle n'est pas indispensable pendant la germination de *Brassica napus oleifera*, *Sinapis alba*, *Papaver somniferum*, *Carum carvi* ; elle est avantageuse, mais non indispensable pour *Polygonum fagopyrum* et *Linum usatissimum* ;

3° la présence de tous les sels nutritifs [$NO^3K$, $PO^4HK^2$, $SO^4Mg$, $(NO^3)^2Ca$] est avantageuse pour *Polygonum fagopyrum*, *Brassica oleracea*, *Brassica napus oleifera*, *Ricinus africanus*, *Cucurbita Pepo*, *Sinapis alba*, *Papaver somniferum*, *Helianthus annuus*, *Zea Mais*, *Carum carvi* ;

4° les matières salines nutritives favorisent pendant quelque temps le développement des jeunes plantes, en l'absence de chaux, dans le cas de *Polygonum fagopyrum* et de *Zea Mais* ;

1. Raumer et Kellermann. 1880, *Landw. Vers. Stat.*, t. XXV, p. 25.
2. Liebenberg. 1881, *Sitzb. Akad. Wiss. Wien*, t. LXXXIV, p. 405.

5° enfin *Medicago sativa* exige pour épuiser les matières de réserve de sa graine des substances minérales autres que les sels de calcium.

Dehérain et Bréal (1) ont également étudié « l'influence des matières minérales dans la germination ». Ils formulent les conclusions suivantes :

« 1° Pendant la première partie de leur développement les « jeunes plantes absorbent une quantité considérable de matiè- « res minérales.

« 2° Elles absorbent même, en quantités notables, des « substances minérales qui ne paraissent avoir aucune influence « avantageuse sur leur développement.

« 3° De toutes les matières minérales employées, la *chaux* « est celle qui exerce l'influence la plus avantageuse. En effet, « des graines mises à germer dans de l'eau de fontaine évo- « luent normalement à la température ordinaire, tandis qu'el- « les ne se développent que très mal dans l'eau distillée. L'in- « fluence heureuse des sels de chaux est particulièrement « sensible sur le développement de la racine.

« 4° La forme sous laquelle la chaux est présentée est loin « d'être indifférente, elle exerce une action sensiblement plus « avantageuse quand elle est combinée à l'acide ulmique que « lorsqu'elle est unie à l'acide azotique, comme si l'acide ulmi- « que concourait directement à la nutrition de la jeune plante.

« 5° Cependant, on ne peut pas admettre que l'addition de « chaux étrangère à la graine soit nécessaire à l'évolution de la « jeune plante, car en exposant des graines placées dans l'eau « distillée à une température de 30 à 35°, on les voit souvent « se développer normalement sans qu'on puisse déceler de « chaux dans les organes nouvellement formés. »

Plusieurs de ces conclusions sont critiquables et Dehérain lui-même (2) a signalé une grave cause d'erreur qui s'applique du reste non seulement à ses propres travaux, mais également

1. Dehérain et Bréal. 1883, *Ann. Agron.*, t. IX. p. 58.
2. Dehérain. 1902, *Tr. Ch. agric.*, p. 55.

à ceux de ses prédécesseurs : l'eau distillée employée comme milieu témoin dans toutes ces expériences n'est pas pure ; préparée le plus souvent dans des appareils métalliques, elle renferme des traces de cuivre qui la rendent impropre à la végétation (1). D'après Dehérain, cette constatation rend nécessaire la révision de toutes les expériences effectuées auparavant sur le rôle des substances minérales dans la germination.

La conclusion de Dehérain et Bréal relative à l'influence de la température a été combattue par Portheim (2) ; cet auteur a prouvé l'indispensabilité de la chaux pour la jeune plante en particulier à la température de 30-35°.

Je citerai encore, parmi les travaux mettant en évidence le rôle utile du calcium, ceux de Heiden (3) et de Prianischnikow (4).

Le premier montre que des plants de *maïs* et de *pois*, cultivés en solution nutritive incomplète, meurent plus tôt lorsque le liquide est privé de calcium que lorsqu'il manque soit de magnésium, soit de potassium.

Prianischnikow observe que les pousses de *Vicia sativa* se développent plus vite dans une solution de sulfate de calcium que dans l'eau distillée.

Les travaux parus ultérieurement à ceux-ci sur la question qui nous occupe se rapportent plus particulièrement à l'étude du mode d'action du calcium ; je n'en parle pas ici, puisqu'ils seront analysés plus loin en détail.

Je dois pourtant mentionner un travail récent de Chancerel (5) sur « le rôle du calcium dans la végétation forestière ». L'auteur cultive des jeunes plants de *Chêne pédonculé*, de *Bouleau commun*, de *Peuplier tremble*, de *Hêtre*, de *Frêne*

1. Dehérain et Demoussy. 1901, *C. R. Ac. Sc.*, t. CXXXII, p. 523.
   Coupin. 1901, *C. R. Ac. Sc.*, t. CXXXII, p. 645.
   Devaux. 1901, *C. R. Ac. Sc.*, t. CXXXII, p. 717.
2. Portheim 1901, *Sitzb. Akad. Wiss. Wien*, t. CX, p. 113.
3. Heiden. 1888, *Centralbl f. Agr. Chem*, t. XVII, p. 622
4. Prianischnikow, 1895, *Landw. Vers. Stat*, t. XLV, p. 247.
5. Chancerel. 1914, *Rev. gén. Bot.*, t. XXV *bis*, p. 83.

*commun*, d'*Aune glutineux*, de *Pins maritime*, *sylvestre* et *noir*, des boutures de *Saule viminal* et de *Laurier rose*, dans de l'eau distillée ou dans différentes solutions salines [$SO^4Ca$, $CO^3Ca$, superphosphates, $SO^4(NH^4)^2$, $NO^3NH^4$, $NO^3Na$, $NO^3K$, $SO^4K^2$, KCl, $SO^4Mg$, $SO^4Fe$, etc. : 25 cgr. à 2 gr. par litre], ou encore sur du sable ou un sol siliceux arrosés ou non des mêmes solutions.

Il observe que les sels de calcium sont extrêmement favorables, tandis que les composés des autres métaux sont nuisibles aux doses employées.

Il conclut de ses recherches que « *les composés calciques sont les vrais accélérateurs de la végétation ligneuse* ».

Si nous résumons les résultats des expérimentateurs précédents, nous voyons que tous sont d'accord pour attribuer au calcium un rôle dans le développement des plantes supérieures.

Quelle est la *nature de ce rôle ?* C'est ce que nous allons examiner maintenant.

L'auteur qui depuis une vingtaine d'années s'est surtout occupé de la question du calcium est Lœw. Nous avons déjà rencontré son nom à propos des travaux sur les végétaux inférieurs. Ses observations l'ont amené à formuler une *théorie explicative* de l'importance physiologique du calcium pour les plantes vertes. Lœv appuie sa théorie sur les faits suivants :

1° Les tissus les plus riches en noyaux ou en corps chlorophylliens sont aussi ceux qui renferment le plus de calcium. En particulier, les feuilles vertes contiennent plus de chaux que les feuilles étiolées.

2° Les oxalates solubles et les sels de magnésium sont extrêmement toxiques pour les plantes ayant besoin de calcium. Ces corps agissent nocivement sur la cellule en déterminant d'importantes modifications du noyau et des corps chlorophylliens. Le fluorure de sodium et les sels de strontium exercent la même action nuisible que les oxalates solubles et les sels de magnésium.

Lœw déduit de ces faits que dans les noyaux et les corps chlorophylliens des végétaux supérieurs existent des *composés organiques du calcium* (*calcium-protéines*) jouant un rôle essentiel dans la vie de la plante. De tels composés posséderaient une capacité bien définie pour l'imbibition, capacité qui varierait avec le remplacement du calcium par un autre élément métallique ; la modification de la teneur en eau qui résulterait de cette substitution déterminerait un trouble de structure fatal à la plante.

Pour Lœw, la toxicité des oxalates solubles et celle du fluorure de sodium s'explique par la propriété que possèdent ces corps d'arracher le calcium de ses combinaisons. Ils détruisent ainsi les composés calciques du noyau et des corps chlorophylliens.

Quant à l'influence nocive du magnésium (et aussi celle du strontium), Lœw l'interprète de la façon suivante : si le magnésium pénètre dans la plante combiné à un acide fort, la chaux unie aux protéines du noyau et des corps chlorophylliens se combinera, en tant que plus forte base, avec l'acide du sel de magnésium, tandis que la magnésie prendra la place de la chaux dans le composé organique. La capacité d'imbibition sera modifiée par suite de cette substitution et il en résultera un arrêt des fonctions vitales.

D'après la loi de l'action des masses, un excès de sel de calcium empêchera cette réaction nuisible ; d'où rôle antitoxique spécifique du calcium vis-à-vis du magnésium et aussi du strontium.

Donc, d'après Lœw, le calcium serait un des *éléments plastiques* les plus importants de la plante, puisqu'il concourrait à l'édification de la substance nucléaire, à celle des chloroplastes et que, pour cette double fonction, il ne pourrait être remplacé par aucun autre élément.

De tels composés « *calcium-protéines* » seraient caractéristiques des végétaux supérieurs (y compris les champignons et les algues d'organisation complexe). On les rencontrerait aussi chez tous les animaux, mais ils n'existeraient pas chez les champignons e es algues d'organisation simple.

Cette théorie a été vivement critiquée par plusieurs physiologistes [Benecke (1), Bruch (2), Osterhout (3)]. Les arguments sur lesquels Lœw l'appuie ne sont pas en effet aussi convainquants que cet auteur le soutient :

La teneur élevée en calcium des tissus riches en noyaux a été surtout établie pour les organes animaux (glandes, substance grise du cerveau). Chez les végétaux, il ne paraît pas que cette relation existe ; ainsi les tissus jeunes (méristèmes), bien que riches en noyaux, renferment assez peu de calcium pour que certains auteurs (Schimper) (4) aient pu y méconnaître la présence de cet élément.

La teneur en calcium des feuilles ne semble pas en rapport avec la quantité de chlorophylle, mais avec d'autres facteurs, par exemple la transpiration.

Le fait que la toxicité de l'acide oxalique et des oxalates solubles est limitée aux plantes ayant besoin de calcium s'explique très aisément par la propriété que possèdent ces corps d'insolubiliser ce métal, sans que cela implique la présence de composés calciques dans les noyaux et les corps chlorophylliens ; le calcium pouvant être, par d'autres fonctions, essentiel à la plante.

Enfin, l'objection la plus sérieuse que l'on puisse faire à la théorie de Lœw est que d'autres métaux que le magnésium sont toxiques pour la plante en l'absence de calcium sans qu'on puisse invoquer, pour expliquer leur action nocive, les raisons données par Lœw dans le cas du magnésium C'est ainsi que le potassium, bien qu'étant une base plus forte que le calcium est, à une concentration suffisante, nuisible pour la plante comme le magnésium.

Nous verrons plus loin que le rôle antitoxique du calcium ne s'exerce pas seulement vis-à-vis du magnésium, comme le vou-

1. Benecke. 1904, *Bot. Zeitg.*, t. LXII, p. 97.
2. Bruch. 1901-1903, *Land. Jahrb.* (cité d'après Benecke).
3. Osterhout. 1909, *Bot. Gaz.*, t. XLVII, p. 148.
4. Schimper. 1890, *Flora*, t. XLVIII, p. 207.

drait la théorie de Lœw, mais encore vis-à-vis d'autres métaux tels que le potassium, le sodium, l'ammonium.

L'innocuité du magnésium pour les végétaux inférieurs, s'opposant à sa grande toxicité pour les plantes supérieures, n'est pas non plus spéciale à cet élément ; d'autres métaux, le potassium et l'ammonium entre autres, partagent cette propriété qui s'explique par le fait que les végétaux inférieurs, les champignons en particulier, sont moins sensibles que les plantes supérieures à certaines actions toxiques.

Enfin, il semble difficile d'admettre que des espèces relativement voisines, choisies dans un même groupe — parmi les Algues vertes, par exemple — diffèrent par un caractère aussi important que la structure du noyau.

Aucun des arguments sur lesquels Lœw appuie sa théorie n'est donc absolument convaincant, et l'existence de composés du calcium dans le noyau et les corps chlorophylliens des végétaux supérieurs reste problématique.

Pourtant, le fait que le calcium n'est indispensable en quantités notables qu'aux végétaux supérieurs semble bien établir que ce métal joue chez ceux-ci un rôle plastique qui n'intervient pas chez les végétaux inférieurs.

Puisque l'hypothèse de Lœw paraît devoir être abandonnée, il nous faut chercher dans l'étude de la composition des végétaux quelque autre indication relative à ce rôle plastique supposé du calcium.

Or les travaux que nous allons exposer maintenant mettent nettement en évidence la présence de composés calciques importants dans la *paroi cellulaire* des plantes vertes.

Les premiers auteurs qui se sont occupés de la constitution de la membrane végétale l'ont considérée comme formée exclusivement de cellulose, mais des études plus approfondies n'ont pas tardé à prouver que cette substance est, dans la membrane, associée à beaucoup d'autres. Parmi ces corps accompagnant la cellulose, les plus importants semblent être les composés pectiques, entre autres le *pectate de calcium*. Ce dernier corps paraît constituer une sorte de ciment, réunissant entre elles

les cellules des tissus mous chez les Phanérogames et les Cryptogames, — les Champignons et beaucoup d'Algues exceptés.

Les composés pectiques ont été étudiés d'abord par Braconnot (1), puis par Vauquelin (2), par Mulder (3), etc.

Frémy (4) dès 1839 entrevoit la possibilité de la présence de composés calciques dans la membrane, mais c'est Payen (5) qui le premier a prouvé l'existence de *pectate de calcium* dans la paroi cellulaire. Ses observations ont porté en particulier sur les Cactées ; il les résume ainsi : « Le pectate de chaux cons-« titue la plus grande partie du poids des substances inter-« posées dans les membranes des couches épidermiques du « cactus ; réuni au pectinate de chaux et de potasse, il formait « les 0,65 du poids total de l'épiderme ». Il dit plus loin : « Les notions positives que je viens d'ajouter relativement à la « présence des composés calcaires dans les membranes, et « parfois dans les méats intercellulaires des tissus végétaux, « indiquent la nécessité de la chaux en divers états dans les « terres cultivées ».

Comme on le voit, Payen reconnaît expressément la nécessité du calcium, en tant qu'élément plastique, pour les végétaux supérieurs.

Frémy (6) en 1883 indiquant la composition chimique du squelette des végétaux cite, à côté des corps cellulosiques, le *pectate de calcium*.

Mangin (7) a repris cette étude de la membrane végétale. Il a fait porter ses recherches en particulier sur la lamelle moyenne

1. Braconnot. 1825, *Ann. Ch. Phys*, 2e série, t. XXVIII, p. 173.
2. Vauquelin. 1829, *Ann. Ch. Phys.*, 2e série, t. XLI, p. 46.
3. Mulder. 1838, *Bull. des Sc. phys. et nat.*, en Néerlande, cité d'après Mangin.
4. Frémy. 1839, *Journ. de Pharm.*, t. XXVI, 2e série, p. 368.
5. Payen. 1846, *Mém Ac. Sc Sav. étr.*, t. IX, p. 148.
6. Frémy. 1883, *Encycl. chim. : Chim. des vég.*, t. IX, p. 3.
7. Mangin. 1888 à 1893. *C. R. Ac. Sc.*, t. CVII, p. 144 ; t. CIX, p. 579 ; t. CX, p. 295 ; t. CX, p. 644 ; t. CXV, p. 260 ; t. CXVII, p. 816 ; 1891-1892, *Journ. de Bot.*, t. V, p. 400 et 440 ; t. VI, p. 12, 206, 235, 363.

ou substance intercellulaire. Comme Payen, il y reconnaît la présence de composés pectiques, entre autres de *pectate de calcium*. Ses résultats ne diffèrent pas sensiblement de ceux obtenus par les auteurs précédents. Il trouve que le pectate de calcium constitue non seulement le ciment qui relie entre elles les cellules, mais que ce composé tapisse aussi d'un revêtement mince la surface des espaces intercellulaires ; parfois même, le pectate de calcium remplit complètement ces espaces, comme dans les tubercules de pommes de terre.

Ce sont ces composés pectiques qui sont attaqués par *Bacillus amylobacter* dans l'opération du rouissage. La gélification de ces corps, sous l'influence du microbe, détermine la séparation des fibres.

D'autres auteurs ont entrevu, sans le préciser, le rôle que joue le calcium dans la formation de la membrane végétale. C'est ainsi que Bœhm (1) écrit : « Afin de former la paroi cel-« lulaire, en partant de l'amidon et du sucre, la chaux est « juste aussi importante que pour la formation des os. La « chaux forme le squelette de la paroi cellulaire ».

Raumer (1) admet avec Bœhm que la chaux est nécessaire pour la croissance et la solidification des membranes végétales.

Nous avons dit que la présence de *pectate de calcium* dans la paroi cellulaire a été signalée chez les Phanérogames et les Cryptogames, à l'exclusion des Champignons et de certaines Algues. Il serait intéressant de vérifier si le besoin de calcium, constaté chez les mêmes végétaux, coïncide exactement avec l'existence, dans la membrane, de tels composés calciques. Peut-être trouverait-on là, l'explication de la nécessité du calcium limitée à un groupe de végétaux. Ceci aiderait à comprendre, entre autres choses, la façon différente de se comporter des diverses espèces d'algues vis-à-vis du calcium ; il est en effet plus facile d'admettre que deux algues assez voisines,

1. Bœhm. 1875, *Sitzb. Akad. Wiss. Wien*, t. LXXXI, p. 287.
2. Raumer. 1883, *Landw. Vers. Stat.*, t. XXIX, p. 253.

ou deux champignons, diffèrent par la constitution de leur membrane que de supposer que ces végétaux se distinguent par la structure de leur noyau,

D'intéressantes recherches de G. Bertrand et Mallèvre (1) ont établi que le rôle du calcium, dans la formation des composés pectiques, n'est pas seulement plastique, mais aussi *catalytique*.

L'apparition de l'acide pectique et des pectates est précédée dans la plante par celle de la pectine ; ce corps, soluble dans l'eau, se transforme sous l'influence d'une diastase particulière, la *pectase*, en une substance insoluble que beaucoup d'auteurs avaient supposé être de l'acide pectique, mais qui est en réalité un pectate. Bertrand et Mallèvre ont montré que lorsqu'on met en présence de la pectine et de la pectase, l'une et l'autre soigneusement décalcifiées, il ne se produit aucune coagulation : la moindre addition d'un sel de calcium soluble détermine, au bout de quelque temps, la formation d'un précipité de pectate de calcium. Si la pectase a été préalablement chauffée à 100°, pour détruire l'action de la diastase, l'addition de chaux reste sans effet. Donc, la chaux ou la pectase agissant isolément sont incapables de déterminer la fermentation pectique ; pour que celle-ci se produise, l'action simultanée de la chaux et de la pectase est nécessaire. La baryte, la strontiane, et même la magnésie, quoique à un degré moindre, agissent comme la chaux.

Bertrand et Mallèvre résument ainsi les résultats de leurs travaux :

« 1° La pectase ne peut, à elle seule, coaguler la pectine ;

« 2° elle ne provoque cette transformation qu'en présence « d'un sel soluble de calcium, de baryum ou de strontium ;

« 3° le coagulum formé dans ces conditions n'est pas, comme « on l'avait cru jusqu'à présent, de l'acide pectique, mais un « pectate alcalino-terreux ».

1. G. Bertrand et Mallèvre. 1894-1895. *C. R. Ac. Sc.*, t. CXIX, p. 1012 ; t. CXX, p. 110 ; 1895, *Bull. Soc. Ch.* 3e série, t. XIII, p. 4, 77, 252.

Ces auteurs ont aussi étudié la *répartition de la pectase* dans le règne végétal (1). Ils ont constaté que cette diastase paraît être universellement répandue chez les plantes vertes, mais ils ne l'ont pas rencontré chez les champignons. Ceci concorde avec ce que les études histologiques nous ont appris sur la répartition du pectate de calcium chez les végétaux.

Voilà donc deux faits distincts, l'un et l'autre solidement établis, qui concourent à prouver que chez les végétaux à l'exclusion des champignons et de quelques algues, le calcium est nécessaire pour la construction de la membrane, en tant qu'élément à la fois plastique et catalytique.

On peut se demander maintenant si le calcium n'intervient pas d'une façon analogue dans des réactions diastasiques végétales autres que la fermentation pectique.

Plusieurs auteurs ont attribué à cet élément un rôle dans le *transport de l'amidon*, or ce phénomène paraît bien sous la dépendance d'une transformation diastasique.

Bœhm (2) montre que les plantules de *Phaseolus multiflorus* cultivées à l'obscurité en l'absence de calcium n'arrivent pas à épuiser les réserves de la graine : le transport de l'amidon des cotylédons vers les organes de la jeune plante ne s'effectue pas. D'une façon générale, dans les plantes privées de chaux et cultivées à l'obscurité, il y a accumulation d'amidon dans la moëlle et l'écorce des parties inférieures de la tige; l'addition de calcium permet à cet amidon de se déplacer vers les parties supérieures.

Bœhm constate ces faits sans trouver d'explication à cette relation nécessaire entre la présence de la chaux et le transport de l'amidon.

Quelques auteurs ont émis à ce sujet diverses hypothèses. C'est ainsi que Kohl (3) suppose que la chaux sert de véhicule aux hydrates de carbone sous forme d'hydrocarbonate de calcium.

1. Bertrand et Mallèvre. 1895, *C. R. Ac. Sc.*, t. CXXI, p. 726.
2. Bœhm. 1875, *Sitzb. Akad. Wiss. Wien*, t. LXXXI, p. 287.
3. Kohl. 1889, Marburg.

Schimper (1) observe aussi une accumulation anormale d'amidon quand le calcium est en quantité insuffisante, mais pour lui, il s'agit là d'un phénomène pathologique secondaire.

Groom (2) explique le rôle du calcium dans le transport de l'amidon par la propriété que possède ce métal d'insolubiliser l'acide oxalique. Pour cet auteur, la forme mobile des hydrates de carbone est le sucre : l'amidon pour être utilisé par la plante doit subir préalablement l'action de l'amylase ; or en l'absence de calcium, il se produirait de l'oxalate acide de potassium nuisible au fonctionnement de cette diastase ; la solubilisation de l'amidon serait ainsi empêchée et il en résulterait l'accumulation de ce corps dans les organes de réserve.

Lœw (3) rattache à son hypothèse l'explication du phénomène. Il admet que l'intensité du transport de l'amidon dépend de deux facteurs : 1° de l'activité saccharifiante des diastases contenues dans les organes de réserve ; 2° de l'activité de formation de l'amidon aux dépens du sucre, dans les autres parties de la plante.

Pour lui, la première condition est liée à l'intégrité des noyaux, puisque ce sont ceux-ci qui fabriquent les enzymes : l'absence de calcium déterminant la mort des noyaux, il en résulte que les cellules ne secrètent plus les diastases nécessaires pour dissoudre l'amidon.

La deuxième condition dépend du bon fonctionnement des chloroplastes : si, par suite du manque de calcium, il ne se forme pas de chloroplastes dans les nouveaux organes, il ne peut pas y avoir non plus production d'amidon en partant du sucre.

Cette explication est ingénieuse, mais nous avons vu que la nécessité du calcium en tant que constituant des noyaux et des corps chlorophylliens est encore à prouver.

Quoi qu'il en soit, il ne paraît pas qu'il y ait, dans l'influence

1. Schimper. 1890, *Flora*, t. XLVIII, p. 207.
2. Groom. 1896, *Ann. of Bot.*, t. X, p. 91.
3. Lœw. 1892, *Flora*, t. L, p. 368 ; 1899, *Bull. U. S. Depart. of Agric.*, n° 18, etc.

du calcium sur le transport de l'amidon, rien de comparable à ce qui existe à propos du rôle de ce corps dans la fermentation pectique. L'action du calcium dans le phénomène que nous venons d'étudier paraît plutôt indirecte.

Du reste, tous les auteurs qui se sont occupés de cette question reconnaissent que de nouvelles recherches sont nécessaires.

Le rôle du calcium dans la vie de la plante, en tant qu'élément plastique et catalytique, semble bien établi par ce que nous savons sur la formation et la constitution de la membrane végétale. Mais il est une autre propriété du calcium, très caractéristique de cet élément, qui s'exerce aussi bien chez les animaux que chez les végétaux supérieurs et qui suffirait à expliquer, à défaut d'autres causes, l'utilité du calcium pour ces organismes : je veux parler de l'*action antitoxique* remarquable exercée par ce métal vis-à-vis des autres constituants du milieu.

Nous avons vu que cette action a été étudiée par Lœb chez les animaux. Chez les végétaux, cette influence antitoxique du calcium a été d'abord observée vis-à-vis du *magnésium*.

Déjà Wolf (1), Bœhm (2), Liebenberg (3) avaient signalé la toxicité du magnésium lorsque ce métal existe seul dans le liquide de culture.

Raumer (4) fait remarquer que les phanérogames, dans la solution de Knop sans calcium, meurent plus tôt si ce milieu renferme des sels de magnésium que s'il n'en contient pas.

Loew en 1892 a proposé l'hypothèse que l'on sait pour expliquer la toxicité du magnésium et le pouvoir antitoxique du calcium vis-à-vis de ce métal. Mais il a montré de plus qu'il y a réciprocité d'action entre les deux éléments, en ce sens qu'un excès de calcium, en l'absence de magnésium, peut

1. Wolf. 1864, *Landw. Vers. Stat.*, t. VI, p. 203.
2. Bœhm. 1875, *Sitzb. Akad. Wiss. Wien*, t. LXXXI, p. 287.
3. Liebenberg. 1881, *Sitzb. Akad. Wiss. Wien*, t. LXXXIV, p. 405.
4. Raumer. 1883, *Landw. Vers. Stat.*, t. XXIX, p. 253.

aussi être préjudiciable à la plante. L'explication qu'il donne de ce fait est la suivante : le rôle du magnésium dans le végétal serait de servir au transport de l'acide phosphorique nécessaire à la formation des nucléo-protéides ; — le magnésium a en effet dans la plante la même répartition que le phosphore et on le rencontre partout où il y a édification de tissus nouveaux. D'après Lœw, le phosphore voyagerait dans la plante sous forme de phosphate dimagnésien ; ce composé, facilement hydrolysable, libérerait de l'acide phosphorique avec formation de phosphate trimagnésien ; ce dernier corps, en présence d'acides faibles, redonnerait du phosphate dimagnésien ; une petite quantité de magnésium pourrait ainsi servir de véhicule à une grande quantité d'acide phosphorique. Mais un excès de calcium, transformant cet acide en phosphate de calcium, rendrait l'assimilation du phosphore impossible.

Lœw a déduit de cette action réciproque du calcium et du magnésium que, dans le substratum, ces deux corps doivent être fournis à la plante en proportion bien déterminée. Il donne au rapport $\frac{CaO}{MgO}$ le nom de *facteur de chaux* (1).

Des travaux extrêmement nombreux, la plupart inspirés par Lœw, ont eu pour but de déterminer ce facteur, aussi bien dans le cas des cultures en pleine terre que dans celui des cultures en milieux artificiels, solides ou liquides.

Les recherches des Japonais Aso, Furuta, Suzuki, Katayama, Kozai, Daikuhara, Nakamura, Takeuchi (2), ont établi que lorsque le calcium et le magnésium sont donnés à la plante sous la même forme (tous deux à l'état soit de carbonate, soit de sulfate), le rapport $\frac{CaO}{MgO}$ doit être égal à 1 dans le cas des *céréales*, à 2, 3 ou 4 dans le cas des plantes plus feuillées qui demandent davantage de calcium ; ces auteurs ont trouvé par exemple, pour la valeur de ce rapport, 2 pour les *crucifères* et le *maïs*,

1. Lœw. 1892, *Flora*, t. L, p. 368.
Lœw et Honda. 1896, *Bull. Coll. Agr. Imp. Univ. Tokyo*, t. II, p. 378.
Lœw et May. 1901, *Bull. Bur. Plant. Ind. U. S. Dept. Agric.*, n° 1, etc.
2. 1902-1908, *Bull. Coll. Agr. Imp. Univ. Tokyo*.

3 pour les *légumineuses*, 4 pour le *tabac*. Si les deux métaux ne sont pas offerts à la plante sous la même forme, le rapport n'est plus le même ; il devient par exemple égal à 30 pour le *riz* lorsque le calcium est fourni sous forme de carbonate et le magnésium sous forme de sulfate (Lœw et Aso) (1).

Les Italiens Bernardini, Corso et Siniscalchi (2) ont repris ces travaux et sont parvenus à des résultats analogues. Mais ils ont trouvé de plus que la valeur du rapport optimum varie avec le moment de la végétation : il est plus faible au début, par suite d'un plus grand besoin de magnésium en relation avec une formation plus active de tissus (nucléo-protéines) et une photosynthèse plus intense (théorie de Wittstäter sur le rôle du magnésium dans la chlorophylle). Il augmente ensuite, car la plante demande davantage de calcium pour la formation et la solidification de la paroi cellulaire. Ces auteurs tirent de leurs recherches la conclusion pratique suivante : « L'action nocive « produite, soit par un excès de chaux, soit par un excès de « magnésie, ne résulte pas des quantités absolues des ions Ca « et Mg absorbés par la plante, mais du rapport dans lequel « ils sont absorbés ; de sorte qu'une addition convenable de « sels de calcium ou de magnésium pourra corriger les effets « nuisibles dus à un excès de l'une des deux bases dans le « substratum. »

Je citerai encore sur le même sujet les travaux de Warthiadi (3) qui a montré chez les *céréales* l'influence néfaste d'un rapport $\frac{CaO}{MgO} < 1$.

Quelques auteurs se sont proposés d'analyser plus profondément ce phénomène. C'est ainsi que True et Bartlett (4) ont

1. Lœw et Aso. 1905, *Bull. Coll. Agr. Imp. Univ. Tokyo*, t. VI, p 335.

2. Bernardini et Corso. 1907, *Ann. d. R. Scuola Sup. d'Agric. de Portici*, t. VII ; 1908, *Staz. Agr. sperim. Ital.*, t. XLI, fasc. 2-4.

Bernardini et Siniscalchi. 1909, *Staz. Agr. sperim. Ital.*, t. XLII, fasc. 4-6.

3. Warthiadi 1911, *Dissert. München* Extrait de *Bot. Centralbl.*, t. CXVII, p. 587.

4. True et Bartlett. 1912, *Bull. U. S. Department of Agr. Bur. Pl. Ind.*, n° 231.

cherché à déterminer comment se modifient l'absorption et l'excrétion des sels par les racines lorsqu'on fait varier la concentration relative du calcium et du magnésium dans la solution nutritive. Ces auteurs ont suivi par la méthode électrique les changements dans la teneur en électrolytes du milieu. Ils arrivent à la conclusion que, pour le *pois*, le maximum d'absorption a lieu lorsque le rapport moléculaire entre le calcium et le magnésium est égal à 1.

Nous avons vu qu'une importante objection à la théorie de Lœw consiste en ce que le rôle antitoxique du calcium ne s'exerce pas seulement vis-à-vis du magnésium, mais encore vis-à-vis d'autres métaux; les travaux de Benecke (1), d'Osterhout (2), de Miyake (3) ont mis en évidence la généralité de cette action.

Les recherches d'Osterhout sont particulièrement intéressantes ; elles ont eu pour but d'étendre aux végétaux les résultats obtenus par Loeb chez les animaux au sujet du rôle antitoxique des sels.

D'après Osterhout, la concentration des sels dans la solution nutritive de Knop est trop faible pour que chacun d'eux, sauf les sels de magnésium, soient toxiques employés séparément ; mais si l'on augmente suffisamment leur concentration, ils deviennent nocifs et, dans ces conditions, on peut alors constater entre le calcium d'une part, le potassium, le sodium et l'ammonium d'autre part, le même antagonisme qu'entre le calcium et le magnésium.

A plusieurs reprises, dans le cours de cet exposé, nous avons fait allusion à l'existence d'*oxalate de calcium* dans la plante. L'étude de ce corps a fait l'objet de très nombreux travaux, tant au point de vue descriptif qu'au point de vue physiologique. Nous nous sommes occupés des premiers à propos de l'étude

1. Benecke. 1904, *Bot. Zeitg.*, t. LXII, p. 97.
2. Osterhout. 1906, *Bot. Gaz.*, t. XLII, p. 127 ; 1907, *Bot. Gaz.*, t. XLIV, p. 259 ; 1909, *Bot. Gaz.*, t. XLVII, p. 148 ; 1912, *Bot. Gaz.*, t. LIV, p. 532.
3. Miyake. 1913, *Journ. of Biol. Chem.*, t. XVI, p. 235.

de la répartition du calcium dans la plante, il nous faut maintenant parler des seconds.

Une première question s'est posée pour les physiologistes : celle de savoir si le calcium est nécessaire à la plante comme précipitant de l'acide oxalique ou des oxalates solubles, — ces corps étant nuisibles à la végétation ; ou bien, si le végétal fabrique au contraire de l'acide oxalique dans le but de se débarrasser d'un excès de chaux inutile à son développement. Dans le premier cas, l'étude de l'oxalate de calcium peut être rattachée à celle du rôle antitoxique du calcium ; dans le second, au contraire, à celle de la toxicité de cet élément.

Parallèlement à cette première question, les physiologistes en ont examiné une seconde ; ils ont cherché ce que devient l'oxalate de calcium formé. Certains considèrent ce corps comme un produit d'excrétion déposé à l'intérieur des cellules d'une manière définitive ; d'autres au contraire admettent qu'il peut être repris dans le métabolisme et jouer ainsi le rôle de substance de réserve.

Quelques auteurs, Schleiden (1), Schimper (2), Groom (3), supposent que l'unique rôle du calcium dans la plante est de précipiter l'acide oxalique ou les oxalates solubles. Cette opinion est trop exclusive, car le calcium est nécessaire à des végétaux qui, comme les *Equisétacées*, les *Muscinées*, certaines *Graminées*, quelques espèces de *Solanées* et de *Liliacées*, ne renferment jamais d'oxalate de calcium (Lœw (4)) ; mais il est très plausible d'admettre que, dans certains cas au moins, l'une des causes qui déterminent la mort de la plante en l'absence de calcium est précisément l'accumulation de l'acide oxalique.

D'après Wehmer (5), il est tout aussi permis d'attribuer à la

1. Schleiden. 1839, *Mém. Ac. St-Pétersb.* 6e série, t. IV (cité d'après Kraus, *Flora*, 1897).

2. Schimper. 1888, *Bot. Zeitg.*, t. XLVI, p. 65 ; 1890, *Flora*, t. XLVIII, p. 207.

3. Groom. 1896, *Ann. of. Bot.*, t. X, p. 91.

4. Lœw. 1899, *Bull. U. S. Dep. Agric. Washington*, n° 18.

5. Wehmer. 1892, *Monatssch. f. Kakteen* (cité d'après Jumelle, *Rev. gén. Bot.*).

présence de la chaux la production de l'acide oxalique que de considérer celui-ci comme la cause de l'absorption de la chaux.

De Vries (1), Stahl (2) admettent que le rôle de l'acide oxalique dans la plante est de précipiter la chaux.

Amar (3) a cru prouver ce fait de la façon suivante : il examine des coupes de feuilles de végétaux (*Caryophyllées*) s'étant développés sur un liquide nutritif renfermant des doses croissantes de nitrate de calcium ; il observe que les cristaux d'oxalate de calcium n'apparaissent dans les feuilles que pour une certaine teneur du milieu en calcium ; les cristaux d'oxalate deviennent de plus en plus nombreux à mesure que la proportion de calcium augmente. Amar tire de ces faits la conclusion suivante : « La chaux (sous forme de nitrate), nécessaire à la « constitution et par suite au bon fonctionnement physiologi- « que de la plante, est entièrement assimilée jusqu'à une cer- « taine proportion variable avec l'espèce ; au-dessus de cette « proportion, elle est éliminée sous la forme de cristaux d'oxa- « late de calcium, comme étant inutile. Il semble résulter par « suite que, contrairement à ce que pensent certains auteurs « tels que Bœhm, Schimper et Groom, la formation de l'oxalate « de chaux aurait pour but l'élimination de la chaux superflue, « plutôt que l'élimination de l'acide oxalique ».

Cette opinion paraît très discutable : la production d'acide oxalique par la plante, *dans le but* d'insolubiliser la chaux, semble en opposition avec ce que nous savons sur la question de l'acide oxalique et du calcium. Il est admis en effet que la formation de l'acide oxalique est en relation avec quelque processus du métabolisme, — oxydation incomplète des hydrates de carbone, élaboration ou destruction des albuminoïdes. On conçoit que si cet acide rencontre un sel de calcium, il puisse donner de l'oxalate qui se dépose dans la plante, ou parfois

1. De Vries. 1881, *Landw. Jahrb.* (cité d'après Schimper, *Flora*, 1890).
2. Stahl. 1900, *Jahrb. f. wiss. Bot.*, t. XXXIV, p. 539.
3. Amar. 1903, *C. R. Ac. Sc.*, t. CXXXVI, p. 901 ; t. CXXXVII, p. 1301 ; 1904, *Thèse Paris* ; 1904, *Ann. des Sc. nat. Bot.*, 3e série, t. XIX, p. 195.

y rester dissous en petites quantités. L'acide oxalique étant toxique pour les végétaux supérieurs, on comprend qu'il puisse être nécessaire de fournir à la plante un excès de calcium pour insolubiliser l'acide produit; mais on ne s'explique pas par quel mécanisme le calcium — du reste très peu toxique comme nous le verrons — déterminerait la formation de l'acide oxalique destiné à l'éliminer.

Les recherches histologiques d'Amar auraient beaucoup gagné en précision, et par suite en intérêt, si elles avaient été complétées et vérifiées par l'analyse chimique. Rien ne prouve en effet que les plantes qu'il a étudiées ne renfermaient pas, en présence des faibles doses de calcium, un excès d'acide oxalique. Les résultats observés par Amar pourraient alors recevoir l'interprétation suivante : dans les feuilles des végétaux développés dans les milieux sans calcium, il ne se forme pas d'oxalate de calcium par suite précisément du manque de chaux; la plante se développe mal parce qu'elle est privée d'un aliment nécessaire. Lorsque la quantité de calcium dans le milieu est faible, l'absence de cristaux dans les coupes observées peut s'expliquer par leur rareté dans le végétal ou parce que l'oxalate de calcium est à l'état dissous. Si la dose de calcium est plus considérable, les cristaux apparaissent et leur nombre va en augmentant jusqu'à un maximum correspondant à la complète saturation, par la chaux absorbée, de l'acide oxalique produit dans le métabolisme.

Il serait intéressant de reprendre les expériences d'Amar en dosant comparativement l'acide oxalique total et le calcium dans les plantes cultivées sur les différents milieux.

Du reste, il subsiste encore bien des points obscurs à propos de la présence de l'acide oxalique et des oxalates dans les végétaux. L'étude des espèces renfermant, à côté d'oxalate de calcium, de l'acide oxalique libre et des oxalates solubles pourrait fournir des résultats curieux.

La seconde question qui mérite de retenir notre attention est de savoir si l'oxalate de calcium formé dans la plante est définitivement rejeté comme inutile ou capable de jouer encore

un rôle dans le végétal ? De très nombreux travaux ont été publiés sur cette question.

Certains auteurs tels que Aé (1), Tschirch (2), Schimper (3), Alberti (4), Kohl (5), Holfert (6), Belzung (7), Wahrlich (8), Kraus (9) supposent que l'oxalate de calcium déposé à l'état cristallin peut, dans certaines conditions, être redissous, se déplacer à travers le végétal et être utilisé comme substance de réserve. C'est ainsi que Kohl, Belzung, Wahrlich, Kraus, ont pu montrer que des cristaux d'oxalate de calcium déposés dans des graines (*cotylédons de lupin*), pouvaient au cours de la germination être attaqués, rongés par un dissolvant particulier, — l'acide oxalique d'après Wahrlich, — et même disparaître complètement. Aé, Kraus admettent que le corps qui serait utilisé par la plante, après cette dissolution, serait le calcium et non l'acide oxalique.

Wehmer (10), Monteverde (11), Amar (12) considèrent au contraire l'oxalate de calcium comme un produit d'excrétion et non comme une matière de réserve. Ces auteurs n'ont jamais pu observer de migration de ce sel ; on le retrouve toujours, d'après eux, à l'endroit où il a été déposé.

Entre ces deux opinions extrêmes, quelle est celle qu'il convient d'adopter ? Les observations ayant porté d'une part sur

1. Aé. 1869, *Flora* t. XXVII, p. 177.
2. Tschirch. 1887, *Bot. Centralbl.*, t. XXXI, p. 223.
3. Schimper. 1890, *Flora*, t. XLVIII, p. 207.
4. Alberti. 1890, *Boll. d. soc. ital. d. microsc*, t. I.
5. Kohl. 1890, *Bot. Centr* , t. XLIV, p. 337.
6. Holfert. 1890, *Flora*, t. XLVIII, p. 279.
7. Belzung. 1892, *Ann. Sc. nat. Bot.*, 7e série, t. XV, p. 203.
8. Wahrlich. 1892, *Inaugural. Dissert.* Marburg (cité d'après Jumelle. *Rev. gén. de Bot.*).
9. Kraus. 1892, *Bot. Centralbl* , t. XLIX, p. 181 ; 1907, *Flora*, t. LVIII, p. 54.
10. Wehmer. 1889, *Ber. d. deut. bot. Ges.*, t. VII, p. 216 ; 1889, *Bot. Zeitg.*, t. XLVII, p. 141 et 165 ; 1891, *Bot. Zeitg.*, t. XLIX, p. 149, 165 et 181.
11. Monteverde. 1891, *St-Pétersbourg* (cité d'après Benecke. *Bot. Zeitg.* 1903).
12. Amar. 1904, *Thèse Paris* ; 1904, *Ann. des Sc. nat. Bot.*, 8e série, t. XIX, p. 195.

des graines, d'autre part sur des tiges et des feuilles, il est fort possible qu'elles soient exactes dans tous les cas et que, suivant les conditions chimiques réalisées, l'oxalate de calcium soit repris dans le métabolisme ou bien reste indéfiniment à l'endroit où il a été formé.

Nous venons de passer en revue les fonctions du calcium en tant qu'élément plastique, catalytique, antitoxique, il nous reste à examiner une dernière propriété de ce corps : sa *toxicité*.

Nous avons dit que tous les éléments peuvent devenir nocifs si leur concentration dans le milieu est suffisamment élevée. Le calcium n'échappe pas à cette loi générale. On trouve des exemples de sa toxicité, par exemple dans les travaux de Lidforss (1) et de Correns (2), le premier ayant expérimenté sur les *grains de pollen*, le second sur *Drosera rotundifolia*.

A quelle dose le calcium commence-t-il à être nuisible pour la plante ?

Coupin (3) qui s'est occupé particulièrement de cette question a cherché à déterminer ce qu'il appelle l'*équivalent toxique*, c'est-à-dire le poids du composé qui dissous dans 100 gr. d'eau est suffisant et nécessaire pour produire la mort de la plantule (*blé*).

Il trouve pour les sels de *calcium* les chiffres suivants : bromure, 3 ; chlorure, 1,85 ; iodure, 0,31 ; azotate, 4 ; phosphate, 2,5.

Si l'on compare cette toxicité du calcium à celle des autres métaux alcalino-terreux, on voit qu'elle est un peu plus faible que celle du *strontium* : bromure, 2 ; chlorure, 1,5 ; iodure, 0,093 ; azotate, 3,5 ; elle est bien inférieure à celle du *baryum* : bromure, 0,62 ; chlorure, 0,235 ; iodure, 0,019 ; azotate, 0,185.

Si au lieu de chercher à déterminer la dose qui tue la plantule, on essaye d'établir simplement celle qui agit encore noci-

1. Lidforss. 1896, *Jahrb. f. Wiss. bot. Ges.*, t XXIX p. 36.
2. Correns. 1896, *Bot. Zeitg.*, t. LIV, p. 21.
3. Coupin. 1900, *C. R. Ac. Sc.*, t. CXXX, p. 791 ; 1901, *C. R. Ac. Sc.*, t. CXXXII, p. 645.

vement sur les racines, on trouve que ce résultat est atteint avec le chlorure de calcium pour une concentration égale à $\frac{1}{260}$.

Maquenne et Demoussy (1) ont abordé d'une façon originale l'étude de la toxicité. Ils font flotter à la surface de la solution qu'ils se proposent d'examiner de jeunes feuilles de même dimension, entières ou ayant leurs bords tranchés ; ils choisissent comme indice macroscopique de la mort du protoplasme le noircissement des feuilles. Ils expérimentent avec des solutions toutes à 1 0/0 et ils observent le *temps* que les feuilles mettent à noircir complètement dans les différents liquides.

Voici quelques-uns des résultats qu'ils ont obtenus avec des feuilles entières :

$CaCl^2$, 5 semaines ; NaCl, 23 jours ; $NO^3K$, 17 jours ; KCl, 14 jours ; $BaCl^2$, 14 jours ; $NH^4Cl$, 5 jours ; $SO^4(NH^4)^2$, 5 jours.

Avec des feuilles à bords tranchés, ils ont trouvé que les chlorures des différents métaux produisent le noircissement au bout des temps suivants :

Ca, plus d'un mois ; Na, plus de 18 jours ; K, 7 jours ; Sr, 6 jours ; Mg, 5 jours ; Ba, 3 jours ; $NH^4$, 3 jours.

D'une façon générale, tous les auteurs s'accordent à reconnaître que la toxicité des sels de calcium est faible.

Je citerai encore les recherches de Magowan (2) qui ont montré que la toxicité des chlorures des principales bases du sol décroît dans l'ordre suivant : Mg, Na, K, Ca.

Lorsqu'une plante verte est cultivée soit dans la terre, soit dans une solution nutritive artificielle, un des premiers effets produit par un excès de carbonate de calcium est la *chlorose des feuilles*.

Cette maladie a été en particulier observée dans le cas de la *vigne* ; lorsqu'on a voulu remplacer, sur des terrains très calcaires, les plants français par des plants américains, on a constaté que ces derniers supportaient mal l'excès de chaux : leurs feuilles restaient pauvres en chlorophylle. Le

1. Maquenne et Demoussy. 1910, *C. R. Ac. Sc.*, t. CLI, p. 178.
2. Magowan. 1908, *Bot. Gaz.*, t. XLV, p. 45.

remède préconisé pour guérir la plante est l'aspersion de sulfate de fer sur les feuilles (Joulie) (1).

Mazé (2) et ses élèves ont entrepris l'étude systématique de la chlorose calcaire des plantes vertes et sont parvenus aux résultats suivants :

La chlorose n'est pas produite directement par un excès de calcium, mais par la privation de certains aliments minéraux, le fer et le soufre chez le *maïs*.

C'est le fer qui intervient efficacement dans le traitement par le sulfate de fer de la chlorose due à un substratum trop riche en calcaire, car quelques gouttes d'azotate ferreux à 0,2 0/00 sur les feuilles font apparaître la chlorophylle au bout de trois jours, tandis que le sulfate d'ammonium, à la même concentration, reste sans effet.

*Le carbonate de calcium agit en insolubilisant le fer.*

Certaines plantes, comme le *maïs*, possèdent la propriété de redissoudre ce fer grâce aux excrétions acides de leurs racines (acide malique dans le maïs) ; sur un milieu riche en carbonate de calcium, elles ne contractent pas la chlorose.

D'autres, comme le *lupin*, la *vesce*, moins aptes à produire une quantité suffisante d'acide, n'agissent pas sur le fer insoluble et ne peuvent plus fabriquer de chlorophylle. Dans ce dernier cas, on peut guérir la plante en ajoutant au milieu de culture des acides organiques capables de dissoudre, en présence de carbonate de calcium, de petites quantités de fer (acide tartrique, acide citrique) et de permettre ainsi aux racines d'en emprunter à la solution.

Les *vignes françaises* se comportent comme le *maïs* ; les *vignes américaines*, comme le *lupin* ou la *vesce*.

Dans cette action nocive du carbonate de calcium, le calcium intervient donc indirectement.

1. Joulie 1889, *Bull. Soc. Chim.*, 3e série, t. II, p. 280.
2. Mazé. 1911, *C. R. Ac. Sc.*, t. CLIII, p. 902.
Mazé, Ruot et Lemoigne. 1912, *C. R. Ac. Sc.*, t. CLV, p. 435.
Mazé, Ruot et Lemoigne. 1913, *C. R. Ac. Sc.*, t. CLVII, p. 495.
Mazé, Ruot et Lemoigne. 1914, *Ann. Inst. Past.*, t. XXVIII, p. 47.

Il existe pourtant des végétaux qui semblent souffrir directement de la présence d'un excès de calcium dans le milieu, ce sont les plantes dites *calcifuges*.

Tous les auteurs ont remarqué que le chaulage a pour conséquence de faire disparaître du substratum certaines espèces plus sensibles et de les remplacer par d'autres mieux adaptées au milieu calcaire (L. Daniel) (1).

Les anciens botanistes attribuaient aux besoins différents qu'elles présentent au point de vue alimentaire, la répartition des plantes d'après la nature du sol.

C'est ainsi qu'ils distinguaient :

les *calcicoles*, avides de calcaire ;

les *silicicoles*, préférant la silice ;

les *indifférentes*, n'ayant pas d'exigences particulières.

Les travaux de Fliche et Grandeau (2), ceux de Contejean (3) ont établi depuis que, dans certains cas au moins, le prétendu aliment nécessaire n'a aucune action directe sur la plante et qu'en particulier, les espèces admises autrefois comme exigeant la silice, les *silicicoles*, ne font qu'éviter le carbonate de calcium, qu'elles sont seulement *calcifuges*.

La classification admise maintenant est donc la suivante :

Plantes *calcicoles*, demandant beaucoup de calcium ;

— *calcifuges*, pour lesquelles cet élément semble nuisible ;

Plantes *indifférentes*.

Contejean qui a proposé cette classification explique ainsi la répartition des végétaux : « L'action directe du carbonate de « chaux repousse des terrains calcaires les calcifuges exclu- « sives ; les difficultés de la lutte pour la vie en éloignent les « plus tolérantes. De même aussi, les calcicoles luttent diffici-

1. Daniel. 1891, *Rev. gén. Bot.*, t. III, p. 249.

2. Fliche et Grandeau. 1873, *Ann. Ch. Ph.*, 4e série, t. XXIX, p. 383 ; 1874, *Ann. Ch. Ph.*, 5e série, t. II, p. 354.

3. Contejean. 1875, *C. R. Ac. Sc.*, t. LXXXI, p. 51 ; 1879, *C. R. Ac. Sc.*, t. LXXXVIII, p. 872.

« lement contre les calcifuges et les indifférentes sur un sol « privé de calcaire ».

Dans de très nombreux travaux de géographie botanique, on trouve des listes de végétaux établies d'après la composition du sol où ces végétaux ont été rencontrés le plus souvent. Si l'on compare ces listes, dans le but de classer les espèces en calcifuges et en calcicoles, on n'obtient pas des résultats bien nets.

Il existe en effet tous les termes intermédiaires possibles entre les calcicoles exclusives qui ne vivent que sur les terrains très riches en chaux et les calcifuges strictes qui ne se développent que sur les sols à peu près privés de calcaire. De plus, dans la manière de se comporter d'un végétal vis-à-vis du calcaire, ce n'est pas seulement la proportion de cette substance qui intervient, mais sa nature ; suivant qu'il s'agira d'une roche plus ou moins facile à attaquer et à dissoudre, les plantes souffriront plus ou moins de l'excès de chaux. Le climat a aussi de l'importance : dans une région sèche, les végétaux supportent plus facilement un terrain calcaire que dans une région humide.

La question est d'après Guffroy (1) encore beaucoup plus compliquée, car pour cet auteur il y aurait lieu de distinguer, à côté des espèces calcicoles, calcifuges et indifférentes :

1° des espèces à races les unes calcicoles, les autres calcifuges ou indifférentes ;

2° des espèces à variétés les unes calcicoles, les autres calcifuges ou indifférentes.

D'un travail récent de Kraus (2), traitant de l'influence du sol et du climat sur la végétation, on a pu tirer cette conclusion que, dans nos régions tempérées, seul le *Genêt*, parmi les plantes dites calcifuges, se refuse absolument de croître en sol calcaire ; parmi les calcicoles, seule l'*Hellébore fétide* est nettement caractéristique des terrains riches en carbonate de calcium.

1. Guffroy. 1910, *Bull. Soc. Bot. France*, t. LVII, p. 232.
2. Kraus. 1911, cité dans *Rev. scient.*, t. LXXXVIII, p. 310.

Là encore, pour obtenir des renseignements plus précis, il sera nécessaire de recourir à l'emploi de la méthode synthétique. Par ce procédé seulement, on arrivera à classer avec certitude les plantes d'après la proportion de calcium qu'elles supportent dans le milieu.

Les analystes sont parvenus à d'autres résultats curieux à propos des espèces calcifuges et calcicoles.

Ils ont remarqué que les premières, même sur des terrains pauvres en chaux, fixent de fortes proportions de ce corps, tandis que les secondes, sur des sols très calcaires, n'en absorbent souvent que d'assez faibles quantités.

C'est ainsi que Berthier (1) en 1826 après avoir montré que non seulement la nature du sol, mais encore celle de la plante influent sur la composition des cendres ajoute : « Aussi voit-on « des arbres qui croissent dans un sol purement argileux et « pierreux, tels que le bouleau d'Orléans, le châtaignier et « l'aune d'Allevard, donner des cendres très chargées de « chaux, tandis que la cendre du froment du Puiselet n'en con- « tient presque pas, quoi qu'il soit cultivé dans un sol cal- « caire ».

Bobierre (2) en 1872 signale « l'aptitude extrêmement remar- « quable des diverses plantes à extraire la chaux d'une lande « siliceuse dans le sol de laquelle l'analyse la révélerait difficilement ».

Donc des végétaux vivant de préférence sur des terrains siliceux et considérés par les botanistes comme n'ayant besoin que de très peu de calcium se montrent au contraire toujours très riches en cet élément.

Fliche et Grandeau (3) ont mis nettement ce fait en évidence dans leurs travaux sur deux espèces calcifuges : le *pin maritime* et le *châtaignier*.

1. Berthier. 1826, *Ann. Ph. Ch.*, 2e série, t. XXXII, p. 240.
2. Bobierre. 1872, *Ann. Ph. Ch.*, 4e série, t. XXV, p. 250.
3. Fliche et Grandeau. 1873, *Ann. Ph. Ch.*, 4e série, t. XXIX, p. 383 ; 1874, *Ann. Ph. Ch.*, 5e série, t. II, p. 354.

Ils arrivent pour ces deux végétaux à des conclusions semblables ; ils les résument en employant intentionnellement les mêmes termes à la fin de deux mémoires parus l'un en 1873 (pin maritime), l'autre en 1874 (châtaignier).

Ils s'expriment ainsi :

« 1° Le pin maritime (ou le châtaignier) est une espèce sili-
« cicole.

« 2° Néanmoins, il absorbe une quantité considérable de
« chaux, même sur des sols très pauvres en cette substance et
« il ne paraît pas avoir des exigences exceptionnelles en fait de
« silice.

« 3° La présence d'un excès de chaux dans le sol a pour con-
« séquence une augmentation dans le taux de ses cendres.

« 4° Sur les sols riches en chaux, il absorbe une quantité nota-
« blement plus grande de ce principe que sur les sols siliceux.

« 5° Cette augmentation a pour conséquence une diminution
« de la quantité de presque tous les autres éléments des
« cendres.

« 6° C'est cette diminution, celle du fer en particulier et
« surtout de la potasse dans une énorme proportion qui paraît
« être la cause du mauvais état de végétation de cette espèce
« sur les sols ainsi constitués. »

Voici quelques-uns des chiffres, d'ailleurs classiques, donnés par les auteurs à l'appui de ces conclusions : ils se rapportent à la composition des cendres de rameaux de *pins maritimes*, les uns bien venants sur un sol pauvre en chaux (renfermant pour 100 parties de terre fine, 0,05 de chaux dans le sol et 0,20 dans le sous-sol), les autres mal venants sur un terrain riche en chaux (contenant 3,25 0/0 de chaux dans le sol et 24,04 0/0 dans le sous-sol).

Ces analyses sont mises en comparaison avec celles d'un *pin laricio*, dit pin noir d'Autriche, végétant bien sur un sol calcaire.

Pour 100 parties de cendres :

| | Pin maritime bien venant | Pin maritime mal venant | Pin noir d'Autriche |
|---|---|---|---|
| | — | — | — |
| Acide silicique . . . . | 9,18 | 6,42 | 7,14 |
| Chaux . . . . . | 40,20 | 56,14 | 49,13 |
| Sesquioxyde de fer . . | 3,83 | 2,07 | 3,29 |
| Potasse . . . . . | 16,04 | 4,95 | 13,56 |

Dehérain (1) commentant tous ces résultats, fait bien ressortir ce qu'ils paraissent avoir d'inattendu : « Le rôle que joue la « chaux dans la végétation est encore singulièrement obscur ; « en effet, l'étude simultanée des terrains sur lesquels croissent « certains végétaux et des cendres qu'ils laissent à l'incinéra- « tion conduit à cette conclusion paradoxale que si la présence « d'une quantité notable de chaux dans le sol empêche le déve- « loppement de certaines espèces, ces mêmes espèces assimi- « lent une quantité de chaux souvent considérable et donnent « des cendres présentant une proportion de cette base assez « grande, même dans les sols très peu calcaires, pour qu'on « soit forcé d'admettre que la chaux est utile à leur développe- « ment ».

Analysant le travail de Fliche et Grandeau, il conclut :

« Ce qui est fort curieux c'est que le pin maritime bien venant, « végétant dans un sol très pauvre en chaux, en ait assimilé « une quantité considérable, peu inférieure à celle que renfer- « ment les cendres du pin laricio qui se plaît dans les sols cal- « caires ».

Nous verrons dans le chapitre IV les hypothèses auxquelles j'ai été amenée par cette constatation.

Il nous reste quelques mots à dire sur la possibilité de *remplacement du calcium* par d'autres éléments.

Quantitativement, il semble que dans les feuilles de quelques végétaux, le *calcium* et le *potassium* puissent, dans une certaine mesure, se substituer l'un à l'autre. Cela ressort des chiffres donnés par Pellet (2) sur la composition des cendres des feuilles de *tabac* poussé sur des terrains différents :

1. Dehérain. 1902, *Tr. Ch. Agric.*, 2e éd., p. 149.
2. Pellet. 1879, *Ann. Ph. Ch.*, 5e série, t. XVII, p. 145.

| | Tabac du Brésil | | Tabac du Lot |
|---|---|---|---|
| Chaux | 15,0 | 20,8 | 28,1 |
| Potasse | 47,1 | 38,1 | 19,5 |
| Magnésie | 8,4 | 7,95 | 8,1 |
| Quantité d'acide sulfurique nécessaire à la saturation des bases | 92,5 | 90,95 | 90,0 |

La proportion totale des bases étant à peu près la même dans tous les cas et la teneur en magnésie n'ayant pas sensiblement varié, il y a donc eu une sorte de compensation entre l'absorption de la chaux et celle de la potasse, mais cela n'implique pas un remplacement pour une fonction physiologique.

A ce dernier point de vue, il est intéressant de considérer surtout les *alcalino-terreux*.

Le *baryum* étant éminemment toxique, de par sa propriété de précipiter les sulfates et d'empêcher ainsi l'assimilation du soufre, il reste à examiner seulement le *strontium*.

Haselhoff (1) admet la substitution de ce métal au calcium. Cet auteur expérimente sur le *haricot* et le *maïs*; il donne d'abord le calcium et le strontium ensemble à la plante, puis il diminue graduellement la proportion de chaux dans la solution. Il tire des résultats obtenus les conclusions suivantes :

1° Les sels de strontium n'ont pas une influence nuisible sur le développement des plantes ;

2° Les sels de strontium sont absorbés par les plantes et semblent remplacer les sels de calcium ;

3° La substitution du calcium par le strontium ne paraît avoir lieu que lorsque la provision de chaux et d'autres substances ne suffit plus à la construction des organes végétaux.

Mais il semble bien qu'on puisse simplement conclure de ces expériences que les sels de strontium ne nuisent pas à la plante lorsque celle-ci a pu préalablement accumuler dans ses tissus une quantité suffisante de calcium.

En effet, toutes les expériences faites depuis celles d'Haselhoff

1. Haselhoff. 1893, *Landw. Jahrb*, t XXII, p. 851 (cité d'après Lœw).

montrent, qu'en l'absence du calcium, le strontium est toxique ; nous en avons vu des exemples plus haut.

Lœw (1) s'est occupé de cette question du remplacement du calcium par le strontium. Il place des branches de *Tradescantia* soit dans une solution de nitrate de calcium à 0,2 0/0, soit dans une solution de nitrate de strontium à la même concentration, ou dans le mélange des deux sels (0,1 0/0 de chaque). Il observe que lorsque la provision de calcium contenue dans la tige est épuisée la toxicité des sels de strontium apparaît. Des expériences de contrôle faites avec l'eau distillée montrent que dans les solutions de nitrate de strontium, les plantes souffrent non seulement de l'absence du calcium, mais encore de la nocivité propre du strontium. La présence d'un sel de calcium neutralise la toxicité du strontium.

Susuki (2) est parvenu à des résultats analogues sur *Hordeum*, *Fagopyrum esculentum*, *Phlox panicula*, *Rubus idæus*, *Coreopsis tinctoria*.

Nous avons vu qu'il existe pourtant un cas où le calcium peut être remplacé par les autres alcalino-terreux, c'est dans la *fermentation pectique*.

Puisque néanmoins la substitution du strontium au calcium ne permet pas le développement de la plante, c'est que sans doute ce dernier élément joue dans le végétal un autre rôle que de contribuer à la formation de la membrane.

Est-ce dans le pouvoir antitoxique du calcium qu'il faut chercher l'origine de la spécificité de son action ? Ceci semble peu probable, car à une concentration convenable le strontium exerce aussi une influence neutralisante sur les autres éléments toxiques.

Une autre cause à laquelle il paraît plausible d'attribuer la non possibilité de remplacement du calcium par le strontium est la différence de toxicité de ces deux métaux. L'expérience a prouvé que pour des concentrations analogues le strontium est

1. Lœw. 1898, *Bot. Centralbl.*, t. LXTIV, p. 257.
2. Susuki. 1899, *Bull. Coll. Agric. Imp. Univ. Tokyo* (cité d'après Lœw).

très sensiblement plus toxique que le calcium. Ceci est en relation avec la valeur respective de leurs poids atomiques : le strontium (= 87) ayant un poids atomique plus élevé que le calcium (= 40) est aussi plus toxique.

Sur cette question, comme sur les précédentes, on voit que de nouvelles recherches sont encore nécessaires.

## CHAPITRE II

# Méthodes de recherche et de dosage du Calcium

Pour rechercher et doser le calcium, j'emploie la méthode classique de *précipitation par l'oxalate d'ammonium* en milieu ammoniacal ou acétique suivant les cas.

Si la solution examinée ne se trouble pas par l'ammoniaque, elle est additionnée de chlorure d'ammonium, puis d'un excès d'ammoniaque. On ajoute goutte à goutte dans le liquide chaud une solution saturée d'oxalate d'ammonium jusqu'à ce qu'il ne se forme plus de précipité. On abandonne 24 heures dans un endroit tiède.

Si dans la substance à analyser, le calcium est accompagné de corps précipitant par l'ammoniaque, on acidifie la liqueur ammoniacale par l'acide acétique et l'on filtre. C'est dans le liquide filtré que l'on ajoute l'oxalate d'ammonium.

Ce dernier cas est celui qui s'est présenté le plus souvent dans mon travail, puisque sauf quelques essais où j'ai dû vérifier la pureté de certains produits chimiques vis-à-vis du calcium, j'ai toujours eu à rechercher et à doser cet élément dans des *cendres végétales*.

Je crois utile de donner ici quelques détails sur la façon d'opérer en partant de la plante fraîche.

Le végétal (champignon ou plante verte) est d'abord *desséché* dans une étuve à 100° jusqu'à poids aussi constant que possible ;

puis il est *calciné* dans un four à moufle jusqu'à l'obtention de cendres blanches. Celles-ci renferment le calcium sous forme de différents sels minéraux ou de carbonate, suivant la nature de la combinaison calcique dans la plante ; on sait que les sels organiques donnent du carbonate. Si la calcination s'est faite à une température élevée, une partie de ce carbonate s'est transformée en chaux. Après refroidissement des cendres dans un dessiccateur, j'effectue une première pesée.

Pour avoir des poids de cendres comparables, je fais une deuxième pesée après *recarbonatation* par le carbonate d'ammonium. J'opère de la façon suivante : je mouille les cendres avec une solution saturée de ce sel, j'évapore au bain-marie ; le carbonate d'ammonium se décompose, l'ammoniaque se dégage et l'anhydride carbonique se porte sur la chaux. Je finis de dessécher en chauffant avec précaution sur une petite flamme. Je pèse après refroidissement. Si cette deuxième pesée donne un résultat très différent de la première, je recommence le traitement des cendres par le carbonate d'ammonium jusqu'à poids constant.

Dans les cendres, le calcium se trouve mélangé à un grand nombre d'éléments dont il s'agit de le *séparer*. Je mouille d'abord les cendres avec de l'acide chlorhydrique concentré jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'effervescence ; j'évapore à sec au bain-marie ; cette opération élimine la silice. Je reprends par quelques gouttes d'acide chlorhydrique et de l'eau distillée chaude et je filtre. Le liquide filtré est neutralisé par l'ammoniaque, il se produit un précipité qui renferme le fer, le manganèse, l'aluminium, les phosphates alcalino-terreux. J'acidifie par l'acide acétique, afin de redissoudre les alcalino-terreux ayant précipité avec les phosphates. Je filtre. J'ajoute à la liqueur acétique l'oxalate d'ammonium, ainsi qu'il a été indiqué plus haut.

Lorsqu'il s'agit simplement de *rechercher* le calcium, je vérifie que le précipité obtenu est bien de l'oxalate de calcium par l'examen spectroscopique de la flamme, ou mieux par l'étude microscopique des cristaux.

Dans le premier cas, je redissous le précipité dans un peu

d'acide chlorhydrique ; à l'aide d'une boucle de platine, je porte de cette dissolution dans la flamme d'un bec Bunsen, sur le bord pour dessécher, puis dans la flamme même ; je regarde au spectroscope si apparaissent les raies caractéristiques du calcium. Ce procédé d'identification, très rapide, présente l'inconvénient de n'être pas très exact. On sait en effet que les poussières de l'atmosphère renferment des traces de calcium qui, dans certaines conditions, peuvent colorer la flamme (1).

Il est donc nécessaire de contrôler par la microchimie les résultats donnés par la spectroscopie. Le précipité amorphe est dissous à chaud dans la plus petite quantité possible d'acide chlorhydrique à 10 0/0 : s'il s'agit bien d'oxalate de calcium, la solution limpide obtenue donne, par refroidissement, après quelques heures, un dépôt cristallisé en octaèdres réguliers.

Pour *doser* le calcium, j'emploie deux méthodes différentes, suivant que le précipité d'oxalate est plus ou moins abondant.

Dans le cas où il s'agit de quantités notables de calcium, je le pèse à l'état de carbonate. A cet effet, je recueille le précipité sur un filtre sans plis : je verse d'abord sur le filtre le liquide clair surnageant ; je lave le précipité dans le récipient où il a été produit en le mettant en suspension dans de l'eau bouillante, je laisse déposer, je verse de nouveau le liquide surnageant sur le filtre ; après un second lavage, je verse aussi le précipité. Pour éviter que le liquide ne passe trouble, il faut avoir soin de ne verser sur le filtre une nouvelle quantité de précipité que lorsque toute la portion précédente a fini de s'égoutter. Je détache les dernières traces du précipité à l'aide d'une baguette de verre terminée par un manchon de caoutchouc. Je vérifie que le liquide filtré ne précipite plus par le chlorure de calcium. Je sèche à 100° le filtre et son contenu. Je sépare ensuite le précipité du filtre ; je calcine ce dernier dans une capsule de platine, puis j'ajoute le précipité. Je chauffe avec précaution au rouge pour transformer l'oxalate de calcium en carbonate. Il se dégage pendant cette opération de l'oxyde

1. Meunier. 1911, *Rev. scient.*, t. 88, p. 305.

de carbone qui brûle souvent à la surface du précipité ; celui-ci de blanc devient légèrement grisâtre et ce changement de coloration permet de noter la fin de la réaction. Je laisse refroidir dans un dessiccateur et j'effectue une première pesée. Comme il est possible que pendant les deux calcinations, celle du filtre et celle du précipité, une partie du carbonate de calcium se soit transformée en chaux, je pèse une deuxième fois après recarbonatation par le carbonate d'ammonium, ainsi qu'il a été expliqué plus haut. J'ai ainsi tout le calcium sous forme de carbonate ; il suffit de multiplier le poids trouvé par $\frac{4}{10}$ pour obtenir le poids de calcium ($Ca = 40$ ; $CO^3Ca = 100$).

Dans beaucoup de cas, ayant eu à doser des quantités de calcium très faibles, inférieures parfois au milligramme, je n'ai pas pu employer la méthode par pesée ; j'ai alors déterminé la quantité d'oxalate de calcium formé, par titrage au moyen du permanganate de potassium. Je décante le liquide contenant le précipité sur un très petit filtre sans plis en ayant soin de ne pas entraîner le précipité ; je lave celui-ci bien complètement dans le récipient où il a été formé, en décantant chaque fois avec précaution le liquide clair surnageant. Je dissous le précipité qui a pu être entraîné sur le filtre et celui resté dans le récipient par l'acide sulfurique chaud à 10 0/0 : je verse l'acide sur le filtre et je recueille le liquide qui passe dans le récipient contenant le précipité. Je veille à ce qu'il ne reste pas sur les parois des traces d'oxalate de calcium non dissoutes. Je dose volumétriquement l'acide oxalique mis en liberté dans cette opération par le permanganate de potassium. La solution de permanganate que j'emploie a été titrée par l'oxalate d'ammonium de façon à ce que 1 cc. corresponde à 1 mgr. de calcium; elle permet donc d'apprécier le $\frac{1}{20}$ de milligramme.

## CHAPITRE III

# Rôle du Calcium chez les végétaux inférieurs

La plupart des auteurs — avons-nous vu dans le chapitre I — admettent que les végétaux inférieurs peuvent se passer de calcium.

Doit-on accepter ce résultat comme définitif et n'est-il pas permis de supposer que dans certaines conditions de culture — par une plus complète purification du milieu nutritif par exemple — on ne puisse arriver à mettre en évidence une influence favorisante de ce métal ?

On sait qu'au fur et à mesure que les techniques se sont perfectionnées, on a vu se manifester le rôle de certaines substances qui longtemps avaient été considérées comme indifférentes. Peut-être en est-il de même pour le calcium, et peut-on expliquer l'apparente inutilité de ce corps pour les végétaux inférieurs, par sa présence à l'état de traces dans les substances qui composent le milieu de culture. Cette hypothèse impliquerait que le calcium joue, chez les végétaux inférieurs, le rôle d'élément catalytique et non celui d'élément plastique.

J'ai repris à ce point de vue particulier les expériences de Raulin, en m'efforçant de purifier le mieux possible les constituants du liquide nutritif et en vérifiant, par l'analyse chimique, le résultat de mes opérations.

J'ai choisi comme matériel d'étude l'*Aspergillus niger*. Cette mucédinée, cultivée dans les conditions indiquées par Raulin,

donne des poids de récolte constants à moins de 5 0/0 près, elle se prête donc parfaitement à des expériences comparatives et elle permet d'apprécier, avec une exactitude très satisfaisante pour des recherches biologiques, l'influence des facteurs chimiques ou physiques que l'on étudie.

## I. — Préparation du milieu de culture. Purification des produits. Technique.

La formule de la solution employée par Raulin pour cultiver l'*Aspergillus niger* est la suivante :

| | |
|---|---|
| Eau distillée | 1.500 |
| Sucre candi | 70 |
| Acide tartrique | 4 |
| Nitrate d'ammoniaque | 4 |
| Phosphate d'ammoniaque | 0,60 |
| Carbonate de potasse | 0,60 |
| Carbonate de magnésie | 0,40 |
| Sulfate d'ammoniaque | 0,25 |
| Sulfate de zinc | 0,07 |
| Sulfate de fer | 0,07 |
| Silicate de potasse | 0,07 |

Un tel milieu, préparé comme l'indique Raulin avec des produits « aussi purs que possible », est-il bien réellement exempt de calcium ? *A priori* on peut répondre avec certitude par la négative. On sait en effet combien il est difficile de se procurer des corps absolument dépourvus de traces d'éléments étrangers, surtout de traces d'éléments aussi répandus que le calcium. En particulier, les produits dits « purs » du commerce qu'employait Raulin sont en général bien loin d'atteindre au degré de purification nécessaire pour des recherches un peu précises.

Il m'a du reste été facile de montrer que Raulin devait certainement, à son insu, introduire du calcium dans ses cultures. J'ai fait végéter de l'*Aspergillus* dans les conditions décrites par cet auteur, c'est-à-dire en employant une solution préparée avec des produits purs du commerce et de l'eau

distillée, cette solution étant répartie par 250 cc. dans des cuvettes rectangulaires en porcelaine, mise au thermostat à 35° et ensemencée avec des spores pures de la mucédinée choisie. J'ai ensuite recherché et dosé le calcium dans les mycéliums. En supposant que la moisissure fixe cet élément, ce procédé permet de déceler, non seulement le calcium provenant du liquide de culture, mais aussi celui cédé par le récipient.

Dans ces conditions, j'ai toujours trouvé du calcium : en moyenne 1/2 milligr. par culture faite sur 250 cc. de milieu.

Ce calcium est-il apporté par la solution nutritive ou a-t-il une autre origine ?

Pour répondre à cette question, j'ai dosé le calcium contenu dans le liquide de Raulin préparé comme il vient d'être dit ; plusieurs dosages m'ont montré que ce milieu renferme toujours de 2 à 3 milligr. de calcium par litre, c'est-à-dire une quantité correspondant bien à celle fixée par le mycélium.

En analysant les produits employés, j'ai trouvé que tous, sauf les sels ammoniacaux et le silicate de potassium, renferment du calcium. Le sucre, en particulier, en contient une quantité assez notable : 2 milligr. pour 100 gr. de sucre.

Pour étudier l'action du calcium sur l'*Aspergillus*, il importait donc de purifier, au point de vue de la présence de cet élément, les substances entrant dans le milieu de culture. Certaines d'entre elles étant difficiles à purifier, j'ai dû modifier la formule de Raulin en m'attachant à conserver à peu près la même proportion d'éléments.

Le milieu de culture que j'emploie a la composition suivante :

| | |
|---|---|
| Eau | 1.000 |
| Sucre | 46,60 |
| Bitartrate de potassium | 3,33 |
| Nitrate d'ammonium | 2,66 |
| Phosphate d'ammonium | 0,40 |
| Sulfate d'ammonium | 0,155 |
| Sulfate de magnésium | 0,710 |
| Sulfate de zinc | 0,046 |
| Alun de fer ammoniacal | 0,081 |
| Silicate de potassium | 0,046 |

J'utilise de l'*eau redistillée* dans un appareil de verre sous pression réduite.

Pour débarrasser le *sucre* du calcium, j'opère de la façon suivante : j'ajoute à 1 kgr. de sucre, dissous dans 500 cc. d'eau pure, de l'ammoniaque et 5 cc. d'oxalate d'ammonium à 5 0/0. Je laisse au bain-marie 5 ou 6 heures, puis dans un endroit chaud 2 ou 3 jours. Je filtre ensuite sur papier Berzélius dans un matras taré, j'ajoute au liquide filtré 1 litre d'alcool redistillé ; j'amorce avec un cristal et j'abandonne à la glacière. Au bout de quelques jours, de beaux cristaux de saccharose se sont formés contre les parois du récipient. Pour les utiliser, il suffit de décanter le liquide, de bien égoutter et de laisser sécher les cristaux Je pèse ensuite l'ensemble du sucre et du matras préalablement taré, je dissous dans l'eau pure, j'obtiens ainsi un sirop renfermant une quantité de sucre connue.

Je purifie les *sels* par dissolution dans l'eau pure et recristallisation, jusqu'à ce qu'ils ne donnent plus de précipité par l'oxalate d'ammonium.

Je n'emploie ces corps spécialement purifiés que pour l'étude des très petites doses de calcium ; pour l'étude des doses plus considérables, j'utilise les produits purs du commerce. C'est ce qui explique la présence de petites quantités de calcium dans les témoins de ces dernières expériences (Voir par exemple les chiffres des expériences IV, V, VI, VII, VIII, X).

Mes cultures ont été faites dans des récipients de formes diverses : cuvettes rectangulaires en porcelaine, semblables à celles employées par Raulin (dans mes toutes premières expériences seulement) ; matras ou fioles d'Erlenmeyer de 1 litre 1/2 ; mais le plus grand nombre d'entre elles ont été effectuées dans des cuvettes cylindriques en porcelaine de 16 cm. de diamètre et de 7 cm. 5 de profondeur, fermées par un couvercle en verre de Bohème, maintenu un peu au-dessus du récipient par des agrafes d'aluminium.

Chaque récipient reçoit 250 cc. de liquide ainsi que les doses de calcium dont je veux étudier l'influence.

Supposant *à priori* — à tort, comme nous le verrons plus loin — que le liquide de Raulin renferme une proportion suffisante de soufre et qu'une nouvelle addition de cet élément n'influe pas sur la culture, j'ai le plus souvent introduit le calcium sous forme de sulfate. Dans l'exposé de mes expériences, je n'indiquerai la nature du sel de calcium que lorsqu'un autre que celui-ci aura été employé.

Les milieux de culture ainsi préparés sont stérilisés par chauffage à l'autoclave 20 minutes à 120° ; ils sont ensuite placés dans une chambre thermostat réglée à 35°, puis ensemencés large-

ment avec des spores pures d'*Aspergillus niger* provenant d'un milieu sans calcium.

Les mycéliums sont recueillis lorsque leur surface commence à se couvrir de spores, c'est-à-dire au bout de 4 ou 5 jours de culture suivant la vitesse du développement. Ces mycéliums sont lavés rapidement, deux fois à l'eau distillée, une fois à l'eau redistillée, puis séchés à 100° jusqu'à poids aussi constant que possible.

## II. — Action du Calcium sur le développement de l'*Aspergillus niger*.

Ayant à ma disposition un milieu privé de calcium, — au moins dans les limites de sensibilité de la méthode de recherche et de dosage que j'emploie, — j'ai essayé l'effet de l'addition de petites quantités de calcium comparables à celles qui existent dans le liquide de Raulin non purifié, c'est-à-dire 3 mgr. par litre.

Voici le résultat de deux essais :

**Exp. I :**

| | 1° | | 2° | |
|---|---|---|---|---|
| | Poids sec | Moyenne | Poids sec | Moyenne |
| | grammes | grammes | grammes | grammes |
| A. Sans Ca . . | 4,25<br>4,07 | 4,160 | 4,24<br>4,35 | 4,295 |
| B. Avec Ca . . | 4,18<br>4,15 | 4,165 | 4,25<br>4,41 | 4,330 |

Dans le deuxième essai, pour vérifier si le milieu de culture est bien exempt de calcium — dans les limites indiquées plus haut, — j'ai recherché le métal dans l'ensemble des deux cultures A et dans les cultures B. Je n'ai pas trouvé trace de cet élément dans les cultures A, tandis que j'en ai dosé 1 mgr. dans l'ensemble des deux cultures B.

A cette dose de 3 mgr. par litre, le calcium, bien que fixé par le végétal, semble donc n'avoir aucune action sur le développement de l'*Aspergillus niger*.

J'ai refait d'autres expériences en variant les proportions ajoutées ; voici un exemple des résultats obtenus :

Exp. II :

| Ca introduit dans 250 cc. de milieu | Poids sec | |
|---|---|---|
| milligrammes | grammes | grammes |
| 0 | 3,90<br>3,72 | 3,81 |
| 0,5 | | 3,62 |
| 1 | | 3,82 |
| 2,5 | | 3,80 |
| 10 | | 3,92 |
| 25 | | 4,00 |
| 100 | | 4,16 |

De cet essai et d'autres semblables, j'ai pu conclure que *tandis que les faibles doses de calcium n'exercent aucune influence sur le développement de l'*Aspergillus niger, *l'addition de quantités plus élevées de ce métal détermine une légère augmentation du poids de la récolte ;* nous verrons plus loin comment il convient d'interpréter ce résultat.

## III. — Fixation du Calcium par l'*Aspergillus niger*.

Afin d'étudier d'un peu plus près comment se comporte l'*Aspergillus* vis-à-vis du calcium, j'ai dosé cet élément dans quelques cultures.

Déjà une des expériences précédentes a montré que le mycélium fixe les petites quantités de calcium introduites dans la solution ; les dosages suivants confirment ce fait :

Exp. III :

| Ca introduit dans 250 cc. de milieu | Poids sec | Cendres | Ca fixé |
|---|---|---|---|
| milligrammes | grammes | milligrammes | milligrammes |
| 0 | 4,15<br>4,03 | 326<br>329 | 0 |
| 0,25 | 4,00 | 328 | 0,1 |
| 0,625 | 3,92 | 327 | 0,5 |
| 1,25 | 4,02 | 348 | 1,2 |

Que se passe-t-il pour les doses plus fortes qui paraissent déterminer une légère augmentation de poids ?

Les chiffres ci-dessous montrent qu'elles sont aussi fixées, mais moins complètement.

Corrélativement à la fixation du calcium, on observe un notable accroissement du poids des cendres.

Afin de donner une idée des différences pouvant exister entre deux cultures placées dans des conditions identiques, j'expose ici les résultats se rapportant à deux séries parallèles.

**Exp. IV :**

| Ca introduit dans 250 c.c. de milieu | Poids sec | | |
|---|---|---|---|
| | 1re série | 2e série | Moyenne |
| milligrammes | grammes | grammes | grammes |
| 0 | 3,75 | 3,87 | 3,810 |
| 2,5 | 3,90 | 3,73 | 3,815 |
| 10 | 3,83 | 3,80 | 3,815 |
| 25 | 4,00 | 3,70 | 3,850 |
| 100 | 4,10 | 4,20 | 4,150 |

| | Cendres | | |
|---|---|---|---|
| | 1re série | 2e série | Moyenne |
| milligrammes | milligr. | milligr. | milligr. |
| 0 | 207 | 212 | 209 |
| 2,5 | 245 | 216 | 230 |
| 10 | 255 | 226 | 240 |
| 25 | 276 | 255 | 265 |
| 100 | 398 | 420 | 409 |

| | Ca fixé | | |
|---|---|---|---|
| | 1re série | 2e série | Moyenne |
| milligrammes | milligr. | milligr. | milligr. |
| 0 | 0,25 | 0,25 | 0,25 |
| 2,5 | 2,5 | 2,7 | 2,6 |
| 10 | | 8,0 | 8,0 |
| 25 | 19,8 | 19,9 | 19,85 |
| 100 | 80,0 | 66,8 | 73,4 |

Ces expériences, recommencées avec des sels de calcium autres que le sulfate, ont donné des résultats identiques ; la plus grande solubilité des sels essayés a permis d'étudier l'action de doses plus élevées.

En voici un exemple : dans une première série, le calcium a

été fourni sous forme de chlorure ; dans une deuxième sous forme de nitrate.

**Exp. V :**

| Ca introduit dans 250 cc. de milieu | 1° Ca sous forme de $CaCl^2$ | | |
|---|---|---|---|
| | Poids sec | Cendres | Ca fixé |
| milligrammes | grammes | milligr. | milligr. |
| 0. . . . . | 4,45 | 257 | 0,4 |
| 50. . . . . | 4,47 | 346 | 42,0 |
| 100. . . . . | 4,62 | 445 | 90,8 |
| 500. . . . . | 4,56 | 449 | 96,8 |
| 1000. . . . . | 4,13 | 487 | 104,8 |
| 2000. . . . . | 3,50 | 382 | 72,8 |

| | 2° Ca sous forme de $(NO^3)^2$ Ca | | |
|---|---|---|---|
| | Poids sec | Cendres | Ca fixé |
| milligrammes | grammes | milligr. | milligr. |
| 0. . . . . | 4,40 | 252 | 0,3 |
| 50. . . . . | 4,44 | 337 | 36,0 |
| 100. . . . . | 4,59 | 436 | 59,6 |
| 500. . . . . | 4,18 | 564 | 130,8 |
| 1000. . . . . | 4,04 | 490 | 136,0 |
| 2000. . . . . | 3,55 | 373 | 89,6 |

Les quantités de calcium supérieures à 1 gr. exercent une *action nuisible* sur le développement de la mucédinée. Ceci n'a rien qui doive nous surprendre ; nous savons qu'il s'agit là d'un phénomène très général : tous les sels devenant toxiques à une certaine concentration et peut-être même, dans certains cas, simplement par suite de l'augmentation de la tension osmotique du milieu.

*
* *

Voyons maintenant comment on peut interpréter les différents résultats obtenus.

*L'augmentation du poids des cendres* apparaît très nettement comme la conséquence de la fixation du calcium ; on trouve en effet sensiblement les mêmes nombres lorsqu'on considère pour chacune des cultures, d'une part l'augmentation du poids des cendres, d'autre part le poids de carbonate de calcium correspondant au calcium fixé.

C'est ce qu'indique le tableau suivant où j'ai réuni les chiffres se rapportant aux expériences IV et V.

J'ai calculé l'accroissement du poids des cendres par rapport à la moyenne des témoins. Je ne donne pas le résultat des cultures faites avec des doses toxiques, car elles diffèrent trop des témoins pour pouvoir leur être comparées au point de vue de la fixation des matières minérales.

La colonne I correspond à l'*augmentation du poids des cendres* ; la colonne II au *poids de carbonate de calcium calculé d'après le calcium fixé* ;

| | Ca introduit dans 250 cc. de milieu | 1re série | | 2e série | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | I | II | I | II |
| | milligrammes | milligr. | milligr. | milligr. | milligr. |
| *Exp. IV :* | 2,5 | 36 | 6,25 | 7 | 6,75 |
| | 10 | | | 17 | 20 |
| | 25 | 67 | 49,5 | 46 | 49,75 |
| | 100 | 189 | 200 | 211 | 167 |
| *Exp. V :* | 50 | 91 | 105 | 82 | 90 |
| | 100 | 190 | 227 | 181 | 149 |
| | 500 | 194 | 242 | 309 | 327 |

Les écarts existant entre les chiffres que l'on se propose de comparer s'expliquent aisément par les différences observées même entre des cultures placées dans des conditions absolument identiques.

Voici du reste d'autres chiffres se rapportant à des expériences que j'expose plus loin et qui contribuent à bien mettre en évidence le fait qui nous occupe :

| | Ca introduit dans 250 cc. de milieu | 1re série | | 2e série | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | I | II | I | II |
| | milligrammes | milligr. | milligr. | milligr. | milligr. |
| *Exp. VI :* | 50 | 87 | 103 | 107 | 101 |
| | 100 | 207 | 230 | 214 | 219 |
| *Exp. VII :* | 100 | 196 | 180 | 204 | 184 |
| *Exp, VIII:* | 100 | 193 | 202 | | |
| *Exp. X ;* | 100 | 61 | 59 | 157 | 159 |
| *Exp. XII :* | 50 | 114 | 107 | 121 | 99 |
| | 100 | 219 | 218 | 228 | 228 |

(Dans les expériences VI et XII, la 1re série correspond à l'addition de calcium sous forme de sulfate, la 2e à l'addition de calcium sous forme de nitrate ; dans les expériences VII et X, la 1re série comprend les résultats de cultures de 3 jours, la 2e ceux de cultures de 4 jours. Enfin les expériences IX et XI ne figurent pas dans le tableau, parce qu'elles ne comportent pas le dosage du calcium )

Tous ces chiffres permettent de conclure que *dans les cendres recarbonatées, le calcium fixé se retrouve tout entier sous forme de carbonate* et que l'augmentation du poids des cendres est due uniquement à la présence de ce sel. Nous verrons plus loin la déduction que l'on peut tirer du premier fait.

Comment expliquer maintenant le *léger accroissement de poids du mycélium*, observé pour les doses de calcium voisines de 100 mgr. par 250 cc. de milieu ?

Les différences en plus sont trop faibles, comparativement aux quantités de métal qui les déterminent, pour qu'on puisse les considérer comme résultant d'une influence favorisante de l'élément ajouté. Elles sont sensiblement du même ordre de grandeur que les augmentations du poids des cendres et il est naturel de supposer qu'elles ont la même origine. On arrive du reste à les annuler, ou tout au moins à les diminuer beaucoup, en considérant, non plus le poids sec total, mais le poids de matière organique calculé en retranchant du poids total le poids des cendres.

C'est ce qu'indique le tableau suivant où j'ai réuni les résultats des expériences IV et V. Afin de faciliter la comparaison, je rappelle les *poids secs totaux* (Col. I) à côté des *poids de matière organique* (Col. 2).

| | Ca introduit dans 250 cc. de milieu | 1re série | | 2e série | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | I | II | I | II |
| | milligrammes | grammes | grammes | grammes | grammes |
| *Exp. IV :* | 0 . . . . . | 3,750 | 3,543 | 3,870 | 3,658 |
| | 25 . . . . . | 4,000 | 3,724 | 3,700 | 3,445 |
| | 100 . . . . . | 4,100 | 3,702 | 4,200 | 3,780 |
| *Exp. V :* | 0 . . . . . | 4,450 | 4,193 | 4,400 | 4,148 |
| | 50 . . . . . | 4,470 | 4,124 | 4,440 | 4,103 |
| | 100 . . . . . | 4,620 | 4,175 | 4,590 | 4,154 |

De même que l'augmentation du poids des cendres doit être attribuée à la présence du calcium sous forme de carbonate, de même *l'accroissement de poids du mycélium peut être considéré comme le résultat de la fixation du métal sous la forme d'une combinaison simple.*

Quelle est la nature de cette combinaison ? C'est ce que nous allons étudier maintenant.

## IV. — Forme sous laquelle l'*Aspergillus niger* fixe le Calcium.

Le fait que le calcium fixé se retrouve dans les cendres sous forme de carbonate montre qu'il ne s'agit pas là d'une simple absorption du sel de calcium ajouté au milieu de culture, mais que le métal doit exister dans le mycélium combiné à un acide organique.

Les observations de Duclaux et celles de Wehmer m'ont amenée à penser que cet acide est l'*acide oxalique*.

Duclaux (1) signale en effet la présence de cristaux d'oxalate de calcium dans des cultures d'*Aspergillus* faites sur un millieu renfermant un sel de calcium, mais il ne donne pas de renseignements sur les autres conditions de végétation du champignon.

Wehmer (2), dans son travail sur la formation de l'acide oxalique par l'*Aspergillus*, étudie, entre autres facteurs, l'addition de différents sels de calcium (carbonate, phosphate, nitrate, chlorure). Il constate la présence de l'oxalate de calcium, soit dans le voile mycélien, soit dans le liquide nutritif, suivant les cas. Mais il faut noter que les expériences de cet auteur étaient faites à une température beaucoup plus basse que les miennes (12-14°) et duraient beaucoup plus longtemps (souvent plusieurs semaines).

1. Duclaux. 1883, *Chimie biologique*, p. 220.
2. Wehmer. 1891, *Bot. Zeitg.*, t. XLIX, p. 233.

Afin de me rendre compte si, dans les conditions où j'expérimente, il se forme bien aussi de l'oxalate de calcium, je dose dans les mycéliums l'acide oxalique et le calcium pour vérifier si ces deux corps y existent dans le rapport où on les trouve dans ce sel.

J'emploie pour extraire l'acide oxalique total la méthode de Berthelot et André (1), légèrement modifiée.

Je crois utile de donner ici quelques détails sur cette opération :

Après avoir récolté et lavé le mycélium, je le pèse à l'état humide (j'obtiens environ 25 grammes de champignon pour les cultures effectuées sur 250 cc. de liquide de Raulin). Je le broie dans un mortier et je mets la pulpe obtenue dans un ballon ou une capsule de porcelaine avec 100 cc. d'acide chlorhydrique à 6 0/0 pour 25 grammes de plante humide. Je chauffe au bain-marie pendant une heure, puis je laisse macérer 24 heures. Je filtre sur papier Chardin en m'aidant du vide. Le résidu est repris par 50 cc. d'acide chlorhydrique à 6 0/0. Je filtre de nouveau. Les liquides obtenus dans ces deux opérations successives sont réunis, portés à l'ébullition, filtrés sur un filtre à plis et additionnés d'ammoniaque en excès. Dans le cas où il existe déjà des sels calcaires dans le végétal, j'obtiens, par cette dernière opération, un précipité d'oxalate de calcium impur. J'ajoute alors de 10 à 15 cc. d'une solution d'acide borique concentrée, ainsi que Berthelot et André le conseillent dans leur travail, afin d'éviter la précipitation lente des tartrates, citrates, malates qui peuvent se trouver dans la plante, ou de produire leur redissolution, s'ils se sont déjà déposés. J'acidule ensuite par l'acide acétique et j'achève la précipitation de l'acide oxalique par addition d'acétate de calcium. Je chauffe au bain-marie pendant une heure et je laisse reposer un certain temps. Je recueille le précipité sur un filtre et je le lave. Le précipité ainsi obtenu est encore trop impur pour être pesé en cet état, je le redissous donc dans de l'acide chlorhydrique étendu. Je filtre et je reprécipite par l'ammoniaque. J'additionne de nouveau d'acide borique et d'acide acétique. Je recommence au besoin deux fois cette purification, j'obtiens ainsi tout l'acide oxalique à l'état d'oxalate de calcium. J'ai vérifié une fois pour toutes que le précipité obtenu en suivant cette technique est bien uniquement de l'oxalate de calcium. A cet effet, je recueille ce précipité sur un filtre taré, je le pèse après dessication à 100-105° et je le calcine : je constate que le poids de carbonate de calcium obtenu ainsi correspond bien au poids théorique calculé d'après le poids du précipité d'oxalate.

Si la quantité précipitée est faible, je dose l'acide oxalique par le permanganate de potassium après avoir redissous l'oxalate de calcium dans l'acide sulfurique à 10 0/0.

1. Berthelot et André. 1887, *Ann. de Chim. et Phys.*, 6e série, t. X, p. 289.

Si le précipité est plus abondant, je le calcine et je le pèse à l'état de carbonate de calcium, après recarbonatation par le carbonate d'ammonium.

Lorsque je me propose de déterminer à la fois dans l'*Aspergillus* l'acide oxalique et le calcium, il me faut effectuer les deux dosages sur des échantillons différents. J'aurais pu opérer en séparant chaque mycélium en deux parties égales, mais j'ai trouvé préférable de faire dans toutes ces expériences deux séries de cultures parallèles ; dans les unes, je dose le calcium par la méthode habituelle, dans les autres, l'acide oxalique suivant le procédé que je viens d'indiquer.

Malgré l'impossibilité d'opérer les deux dosages sur la même portion, j'ai toujours obtenu des résultats très concordants ; *l'acide oxalique trouvé dans le mycélium a toujours correspondu*, aussi exactement que le permettent les conditions de l'expérience, *au poids de calcium fixé*.

L'hypothèse émise au début de ce paragraphe se trouve donc vérifiée : dans mes cultures, l'Aspergillus *fixe le calcium à l'état d'oxalate*.

Voici les chiffres des dosages de calcium et d'acide oxalique dans une expérience comprenant deux séries : dans la première, le calcium a été fourni sous forme de sulfate ; dans la deuxième, sous forme de nitrate.

Afin de faciliter la comparaison, j'ai calculé les poids d'oxalate de calcium correspondant d'une part au calcium, d'autre part à l'acide oxalique.

**Exp. VI :**

| | Ca introduit dans 250 cc. de milieu | Ca fixé | $C^2O^4H^2$ | $C^2O^4Ca + H^2O$ correspondant à Ca fixé | $C^2O^4Ca + H^2O$ correspondant à $C^2O^4H^2$ |
|---|---|---|---|---|---|
| | milligr. | milligr. | milligr. | milligr. | milligr. |
| 1° Ca sous forme de $SO^4Ca$ | 0. . . . | 0,5 | 28,8 | » | » |
| | 50. . . . | 41,2 | 99,0 | 150,3 | 160,6 |
| | 100. . . . | 92,0 | 207,0 | 335,8 | 335,8 |
| 2° Ca sous forme de $(NO^3)^2Ca$ | 0. . . . | 0,6 | 15,7 | » | » |
| | 50. . . . | 40,4 | 91,8 | 147,4 | 148,9 |
| | 100. . . . | 87,6 | 182,7 | 319,7 | 296,3 |

Dans l'expérience suivante, j'ai dosé le calcium et l'acide oxalique au bout de 2, 3 et 4 jours de culture.

Exp. VII :

| | Ca introduit dans 250 cc. de milieu | Ca fixé | $C^2O^4H^2$ | $C^2O^4Ca+H^2O$ correspondant à Ca fixé | $C^2O^4Ca+H^2O$ correspondant à $C^2O^4H^2$ |
|---|---|---|---|---|---|
| | — milligr. | — milligr. | — milligr. | — milligr. | — milligr. |
| Cultures de 2 jours : | 0. . . . | 0,05 | 0 | » | » |
| | 100. . . . | 6,0 | 16,4 | 21,9 | 26,6 |
| Cultures de 3 jours : | 0 . . . | 0,35 | 40,5 | » | » |
| | 100. . . | 72,0 | 151,2 | 262,0 | 245,0 |
| Cultures de 4 jours : | 0. . . . | 0.4 | 52,2 | » | » |
| | 100. . . . | 73,6 | 165,6 | 268,0 | 268,0 |

Cette dernière expérience permet en outre d'observer que le calcium n'est fixé en quantités notables par le champignon qu'après un certain temps de végétation : 3 jours le plus souvent, comme c'est le cas dans l'exemple qui vient d'être donné. Nous trouverons plus loin l'explication de ce fait.

## V. — Mécanisme de la formation de l'oxalate de calcium par l'*Aspergillus niger*.

Plusieurs questions se posent à propos de cette formation d'oxalate de calcium :

*1° Que devient l'acide du sel de calcium primitivement introduit dans le liquide de culture ?*

On sait par les expériences de Tanret (1) que lorsqu'on cultive l'*Aspergillus* sur un excès de sels ammoniacaux, l'ammoniaque est consommé et l'acide rejeté dans le milieu de culture. En est-il de même lorsque le sel offert est un sel de calcium ? Le métal étant dans ce cas pris aussi par le champignon, l'acide est-il mis en liberté dans le milieu et vient-il en augmenter l'acidité ?

Ou bien le radical acide est-il fixé, comme le métal, par le mycélium ou trouve-t-il dans le milieu une base à laquelle il se combine ?

1. Ch. Tanret. 1897, *Bull. Soc. Chim.*, 3e série, t. XVII, p. 914.

2° *Quelle est l'origine de l'acide oxalique qui s'unit au calcium ?*

Est-ce, comme le prétendent certains auteurs, la présence de cet élément qui détermine la production de l'acide et s'agit-il là d'une sorte de réaction de défense de l'organisme contre la toxicité possible du métal ?

Ou bien le calcium se combine-t-il à de l'acide oxalique normalement secrété par le champignon ?

Si l'on ne considère que les quantités d'acide oxalique existant dans le mycélium (Exp. VI et VII), on voit qu'elles sont beaucoup plus grandes dans les cultures avec calcium que dans celles sans calcium, ce qui semble donner raison à la première hypothèse. Mais nous verrons plus loin qu'il faut aussi tenir compte de ce qui se passe dans le substratum, celui-ci pouvant aussi renfermer de l'acide oxalique ou des oxalates solubles.

Pour répondre à la première question, — *que devient l'acide du sel primitivement introduit dans le liquide de culture ?* — j'ai déterminé, dans une expérience où le calcium a été fourni sous forme de sulfate, le soufre fixé et l'acidité du milieu.

Je dose le soufre en suivant exactement la méthode décrite par Gabriel Bertrand (1). J'opère sur 1 gr. de mycélium, mais les chiffres donnés sont calculés pour le poids total de la culture.

Pour déterminer l'acidité du milieu, je réunis le liquide de culture et les eaux de lavage du mycélium, j'amène le volume à 500 cc., j'effectue le titrage avec de la soude $\frac{N}{10}$ sur 20 cc. de liquide, correspondant à 10 cc. de milieu primitif ; je rapporte ces résultats au volume total et je les exprime en acide sulfurique normal.

Je donne aussi, à titre d'indication, le poids sec du mycélium et le poids de calcium fixé.

Acidité primitive de 250 cc. de milieu = 6 cc. $SO^4H^2n$ :

1. G. Bertrand. 1907, *Le Caoutchouc et la Gutta-Percha*, n° 41, 4e année, p. 1201.

**Exp. VIII :**

| Ca introduit dans 250 cc. de milieu | Poids sec | Ca fixé | S fixé | Acidité du milieu en $SO^4H^2n$ |
|---|---|---|---|---|
| — | — | — | — | — |
| milligrammes | grammes | milligrammes | milligrammes | |
| 0 . . . . . | 3,85 | 0,4 | 16,0 | 6 cc. |
| 100 . . . . . | 4,33 | 80,8 | 19,3 | 1 cc. |

Cette expérience montre que lorsque le milieu de culture est additionné de sulfate de calcium : 1° *l'augmentation de la quantité de soufre fixé est très faible et n'est nullement en rapport avec le poids de sulfate décomposé ;* — 2° *l'acidité du milieu diminue*, au lieu d'augmenter comme on aurait pu le supposer *à priori*. Il faut donc admettre que le radical $SO^4$ a trouvé dans le milieu quelque base à laquelle il s'est combiné.

L'*influence de l'addition d'un sel de calcium sur l'acidité du milieu* m'ayant paru intéressante à étudier, j'ai repris cette question en observant ce qui se passe aux différents stades du développement de l'*Aspergillus*.

Dans l'*expérience VII*, donnée plus haut à propos du mode de fixation du calcium, j'ai dosé l'acidité des milieux avec et sans calcium aux jours successifs de la culture.

Pour chaque cas, je donne les chiffres se rapportant à des dosages effectués sur deux cultures différentes en même temps que la moyenne des nombres obtenus.

Acidité primitive de 250 cc. de milieu = 6 cc. $SO^4H^2n$ :

| Ca introduit dans 250 cc. de milieu | Acidité du milieu en $SO^4H^2n$ | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Cultures de 2 jours | | Cultures de 3 jours | | Cultures de 4 jours | |
| — | — | | — | | — | |
| milligrammes | cent. cubes | | cent. cubes | | cent. cubes | |
| 0. . . . . | 11,0<br>11,5 | 11,25 | 13,5<br>17,2 | 15,35 | 8,75<br>8,75 | 8,75 |
| 100. . . . . | 7,5<br>8,7 | 8,1 | 3,5<br>4,2 | 3,85 | 1,5<br>1,5 | 1,5 |

*L'acidité dans les milieux sans calcium augmente beaucoup au début de la végétation, passe par un maximum, puis diminue. Dans les milieux avec calcium, l'acidité diminue beaucoup plus vite ; elle est toujours notablement inférieure à celle des milieux sans calcium.*

La nature du sel de calcium offert à l'*Aspergillus* pouvant avoir de l'influence sur les variations de l'acidité, j'ai dosé l'acidité du milieu dans une expérience où le calcium a été donné, dans une première série sous forme de sulfate, dans une deuxième sous forme de nitrate, dans les deux cas à la dose de 100 mgr. de métal pour 250 cc. de milieu.

Acidité primitive de 250 cc. de milieu = 6 cc. $SO^4H^2n$ :

Exp. IX :

| Nature du sel de calcium | Acidité du milieu en $SO^4H^2n$ | |
|---|---|---|
| | Cultures de 3 jours | Cultures de 4 jours |
| | centimètres cubes | centimètres cubes |
| Témoins sans Ca . . . . . | 7,0 | 6,6 |
| $SO^4Ca$ . . . . . | 5,7 | 3,7 |
| $(NO^3)^2Ca$ . . . . . | 5,0 | 2,3 |

Cette expérience, comme les précédentes, montre que l'*acidité est toujours plus faible dans les milieux avec calcium que dans ceux sans calcium.*

Comment expliquer ce fait ? N'est-il pas en relation avec la formation d'oxalate de calcium ?

Ceci nous ramène à l'examen de la deuxième question posée au début de ce paragraphe : *origine de l'acide oxalique qui s'unit au calcium.*

Ne peut-on pas supposer que l'*Aspergillus* secrète normalement de l'acide oxalique, — diffusant dans le substratum s'il ne rencontre pas de base qui l'immobilise, se fixant au contraire dans le mycélium à l'état de sel insoluble s'il se trouve en présence d'un sel de calcium ?

Pour vérifier cette hypothèse, j'ai déterminé, dans l'expérience précédente (*Exp. IX*), non seulement l'acide oxalique fixé par le mycélium, mais aussi celui existant dans le milieu de culture.

Je dose l'acide oxalique du milieu de culture par addition d'acide borique (2 à 3 cc.), d'acide acétique (qq. gouttes), d'acétate de calcium (jusqu'à précipitation totale), aux 20 cc. de liquide neutralisés par la soude dans le titrage de l'acidité ; je ramène par le calcul les résultats trouvés au volume total.

Dans le tableau suivant, j'indique dans la dernière colonne

l'acide oxalique total, c'est-à-dire la somme de l'acide oxalique du mycélium et du liquide.

| | Nature du sel de calcium | $C^2O^4H^2$ du mycélium | $C^2O^4H^2$ du m lieu de culture | $C^2O^4H^2$ total |
|---|---|---|---|---|
| | — | — | — | — |
| | | milligrammes | milligrammes | milligrammes |
| Cultures de 3 jours | Témoins sans Ca . . . | 35,1 | 188,4 | 223,5 |
| | $SO^4Ca$ . . . . . | 93,1 | 15,2 | 108,3 |
| | $(NO^3)^2Ca$ . . . . . | 151,2 | 16,8 | 168,0 |
| Cultures de 4 jours | Témoins sans Ca . . . | 68,4 | 261,5 | 329,9 |
| | $SO^4Ca$ . . . . . | 161,1 | 13,0 | 174,1 |
| | $(NO^3)^2Ca$ . . . . . | 186,3 | 19,7 | 206,0 |

On voit nettement que la quantité d'acide oxalique, très faible dans les mycéliums cultivés sur milieu sans calcium, est au contraire assez considérable dans le liquide servant de substratum ; c'est l'inverse pour les cultures effectuées en présence de calcium.

Donc, *ce n'est pas la présence du sel de calcium qui a déterminé la formation de l'acide oxalique, celui-ci est secrété normalement par le champignon ; si, dans le milieu, cet acide rencontre un sel de calcium, il le décompose et donne de l'oxalate de calcium insoluble qui se fixe dans le mycélium.*

Ceci explique pourquoi on ne trouve de calcium fixé en quantités notables qu'à partir du troisième jour de culture : le début de cette fixation coïncide avec le moment où le mycélium commence à fabriquer de l'acide oxalique (1).

La présence d'un sel de calcium, loin de favoriser la production de l'acide oxalique, semble plutôt l'empêcher. Les chiffres ci-dessus montrent en effet que la quantité d'acide oxalique totale est très sensiblement plus grande dans les cultures sans calcium que dans celles avec calcium. Ce dernier fait a été du reste déjà signalé par Wehmer dans son travail sur la formation de l'acide oxalique par l'*Aspergillus niger*.

1. Certaines races d'*Aspergillus* ne secrètent d'acide oxalique qu'à partir du 4e ou même du 5e jour. C'est très probablement parce qu'il expérimentait sur une telle race que Charpentier a été amené à conclure que l'acide oxalique n'apparaît dans les cultures d'*Aspergillus* qu'après la formation des spores (*C. R. Ac. Sc.*, t. CXLI, p. 367 et 429, 1905).

Revenons maintenant à l'interprétation du fait qui a servi de point de départ à cette étude sur l'origine de l'oxalate de calcium : *plus faible acidité des milieux avec calcium*. Cette diminution de l'acidité est-elle due uniquement à la fixation de l'acide oxalique à l'état de sel de calcium?

Si l'on calcule, en acide sulfurique normal, l'acidité correspondant à l'acide oxalique dosé dans le milieu de culture, et si l'on compare les chiffres trouvés à ceux exprimant l'acidité totale titrée directement, on voit que les différences entre l'acidité totale des milieux avec et sans calcium ne correspondent pas aux différences entre l'acidité calculée d'après l'acide oxalique dosé dans les milieux exempts ou non de calcium.

Voici les chiffres se rapportant à l'*expérience IX :*

| Nature du sel de Ca | Cultures de 3 jours | | Cultures de 4 jours | |
|---|---|---|---|---|
| | Acidité totale | Acidité correspondant à $C^2O^4H^2$ | Acidité totale | Acidité correspondant à $C^2O^4H^2$ |
| | cent. cubes | cent. cubes | cent. cubes | cent. cubes |
| Sans Ca. . . . . | 7,0 | 4,2 | 6,6 | 5,8 |
| $SO^4Ca$. . . . . | 5,7 | 0,35 | 3,7 | 0,3 |
| $(NO^3)^2Ca$ . . . . . | 5,0 | 0,35 | 2,3 | 0,4 |

Les différences, dans le deuxième cas (acidités correspondant à l'acide oxalique du milieu) sont plus grandes que dans le premier cas (acidités totales des milieux avec et sans calcium).

Cette constatation amène à penser que dans les milieux sans calcium tout l'acide oxalique n'est pas à l'état libre, mais qu'une partie y existe sous forme d'oxalate soluble. Cela admis, il paraît vraisemblable de conclure que *les différences d'acidité entre les milieux avec et sans calcium sont dues aux variations dans la quantité d'acide oxalique libre qui s'y trouve.*

Les chiffres des expériences précédentes montrent également que si l'acide oxalique joue un rôle important au point de vue de l'acidité du milieu, il est loin d'être le seul à intervenir. En effet, on peut remarquer que l'acidité augmente beaucoup le deuxième jour alors que la production d'acide oxalique est encore pratiquement nulle ; l'acidité diminue ensuite, bien que

la quantité d'acide oxalique secrétée augmente (Voir par exemple les chiffres des *exp. VII et IX*).

Du reste, le fait que l'on dose une petite quantité d'acide oxalique dans les milieux avec calcium ne peut s'expliquer que par la présence d'un autre acide dans lequel l'oxalate de calcium est légèrement soluble.

Un nouvel exemple de tous les faits exposés plus haut nous est donné par l'expérience suivante qui résume également les résultats contenus dans les paragraphes précédents.

Cette expérience a été faite à une température plus basse que les autres (29°) ce qui a ralenti un peu l'évolution du végétal.

Dans un premier tableau, j'indique le poids sec des mycéliums, le calcium et l'acide oxalique fixés, ainsi que les poids d'oxalate de calcium correspondants ; dans un deuxième tableau, l'acidité du milieu, l'acide oxalique secrété, l'acidité correspondante, l'acide oxalique total (acide oxalique du mycélium + acide oxalique du milieu).

Acidité primitive de 250 cc. de milieu = 6 cc. $SO^4H^2n$ :

**Exp. X :**

| | Ca dans 250 cc. de milieu | Poids sec | Ca fixé | $C^2O^4H^2$ du mycélium | $C^2O^4Ca+H^2O$ correspondant à Ca fixé | $C^2O^4Ca+H^2O$ correspond. à $C^2O^4H^2$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | milligr. | grammes | milligr. | milligr. | milligr. | milligr. |
| Cultures de 2 jours : | 0. . . | 1,45 | 0 | 0 | » | » |
| | 100. . . | 1,46 | 0 | 0 | » | » |
| Cultures de 3 jours : | 0 . . | 3,17 | 0,3 | 4,9 | » | » |
| | 100. . . | 3,38 | 23,6 | 54,0 | 86,1 | 87,6 |
| Cultures de 4 jours : | 0. . . | 4,08 | 0,5 | 23,4 | » | » |
| | 100 . . | 4,27 | 63,6 | 159,3 | 232,1 | 258,4 |

| | | Acidité du milieu | $C^2O^4H^2$ du milieu | Acidité correspondant à $C^2O^4H^2$ du milieu | $C^2O^4H^2$ total |
|---|---|---|---|---|---|
| | | cent. cubes | milligr. | centimètres cubes | milligr. |
| Cultures de 2 jours : | 0. . . | 10,85 | 0 | » | » |
| | 100. . . | 10,25 | 0 | » | » |
| Cultures de 3 jours : | 0. . . | 11,5 | 146,2 | 3,25 | 151,1 |
| | 100. . . | 8,9 | 28,1 | 0,6 | 82,1 |
| Cultures de 4 jours : | 0. . . | 11,1 | 388,4 | 8,8 | 411,8 |
| | 100. . . | 7,4 | 73,1 | 1,65 | 232,4 |

*Augmentation du poids sec du mycélium pour les fortes doses de sels de calcium, en relation avec la fixation du métal ; correspondance entre les poids d'oxalate de calcium calculés d'une part d'après le calcium fixé, d'autre part d'après l'acide oxalique dosé dans les mycéliums ; plus faible acidité des milieux avec calcium en rapport avec la fixation, à l'état de sel insoluble, de l'acide oxalique secrété ; diminution de la quantité totale d'acide oxalique formé dans les milieux avec calcium* : tels sont les résultats mis en évidence et résumés par les chiffres de cette expérience.

## VI. — Interprétation de l'augmentation de poids du mycélium d'*Aspergillus niger* en présence de doses suffisantes de calcium.

Maintenant que nous avons à notre disposition de nombreux chiffres d'expériences, vérifions l'hypothèse énoncée à la fin du paragraphe III, à savoir que l'*augmentation de poids du mycélium est due à la formation d'un composé organique du calcium.*

Nous avons établi que cette combinaison est de l'*oxalate de calcium.* Il suffit donc de montrer qu'on obtient partout sensiblement les *mêmes poids de culture* (en tenant compte des différences qui existent même entre des témoins) lorsqu'on *retranche du poids total le poids d'oxalate correspondant au calcium fixé.*

Voici un tableau donnant les résultats de ce calcul (Col. II). Je rappelle les *poids secs totaux* (Col. I).

| | Ca introduit dans 250 cc. de milieu | 1re série | | 2e série | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | I | II | I | II |
| | — | — | — | — | — |
| | milligrammes | grammes | grammes | grammes | grammes |
| *Exp. IV* | 0. . . . . | 3,75 | 3,75 | 3,87 | 3,87 |
| | 25. . . . . | 4,00 | 3,93 | 3,70 | 3,63 |
| | 100. . . . . | 4,10 | 3,81 | 4,20 | 3,95 |
| *Exp. V* | 0. . . . . | 4,45 | 4,45 | 4,40 | 4,40 |
| | 50. . . . . | 4,47 | 4,32 | 4,44 | 4,31 |
| | 100. . . . . | 4,62 | 4,29 | 4,59 | 4,38 |
| *Exp. VI* | 0. . . . . | 3,14 | 3,14 | 3,18 | 3,18 |
| | 50. . . . . | 3,25 | 3,10 | 3,35 | 3,20 |
| | 100. . . . . | 3,69 | 3,36 | 3,59 | 3,27 |
| *Exp. VII* | 0. . . . . | 4,08 | 4,08 | 3,83 | 3,83 |
| | 100. . . . . | 4,56 | 4,30 | 4,35 | 4,08 |
| *Exp. VIII* | 0. . . . . | 3,85 | 3,85 | | |
| | 100. . . . . | 4,33 | 4,04 | | |
| *Exp. X* | 0. . . . . | 3,17 | 3,17 | 4,08 | 4,08 |
| | 100. . . . . | 3,38 | 3,27 | 4,27 | 4,04 |

On peut remarquer pourtant que dans la plupart des cas où le métal a été donné sous forme de sulfate (expériences IV, VI (1re série), VII, VIII, X), les poids obtenus comme il vient d'être dit sont encore légèrement supérieurs aux poids des témoins sans calcium. Il faut attribuer cette augmentation à l'*influence d'un excès de sulfate.*

L'expérience suivante le prouve :

J'ajoute à du liquide de Raulin différents sulfates, à des doses telles que les proportions de soufre soient celles qui existent dans les quantités de sulfate de calcium correspondant à 50 et 100 mgr. de calcium, c'est-à-dire 40 et 80 mgr. de soufre.

Je compare les chiffres obtenus à des témoins sans calcium et à des témoins additionnés de proportions équivalentes d'un autre sel d'un des métaux essayés.

**Exp. XI :**

| Témoins sur milieu ordinaire | Témoins sur milieu + KCl |
|---|---|
| — | — |
| grammes | grammes |
| 3,70 | 3,69 |
| 3,68 | 3,64 |

| S introduit dans 250 cc. de milieu | Cultures sur milieu ordinaire + sulfates : | | | |
|---|---|---|---|---|
| | $SO^4Ca$ | $SO^4K^2$ | $SO^4Na^2$ | $SO^4Mg$ |
| — | — | — | — | — |
| milligrammes | grammes | grammes | grammes | grammes |
| 40 . . . . . | 3,90 | 3,83 | 3,75 | 3,79 |
| 80 . . . . . | 4,05 | 3,90 | 3,85 | 3,90 |

Cette influence favorisante d'une augmentation de la quantité de soufre a été du reste observée par d'autres auteurs, entre autres par Javillier (1).

Avec une race d'*Aspergillus* particulièrement sensible à l'action du soufre et possédant la propriété de fixer des proportions élevées de calcium, j'ai pu dissocier les deux phénomènes et montrer nettement que l'augmentation de poids déterminée par l'addition de sulfate de calcium est due à la fois à la fixation du métal et à l'influence favorisante du métalloïde.

Le tableau suivant indique, en même temps que les résultats, le plan de l'expérience :

**Exp. XII :**

| | gr. |
|---|---|
| Témoins sur milieu ordinaire | 4,16 |
| | 4,18 |

| Ca ou S introduits dans 250 cc. de milieu | | Cultures sur milieu ordinaire additionné de : | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | $SO^4Ca$ | | $(NO^3)^2Ca$ | | $SO^4K^2$ |
| | | Poids sec | $C^2O^4Ca + H^2O$ correspondant à Ca fixé | Poids sec | $C^2O^4Ca + H^2O$ correspondant à Ca fixé | Poids sec |
| — | | — | — | — | — | — |
| milligr. | milligr. | grammes | milligr. | grammes | milligr. | grammes |
| 50 Ca | ou 40 S | 4,46 | 156,2 | 4,35 | 144,5 | 4,27 |
| 100 » | 80 » | 4,75 | 318,2 | 4,42 | 333,8 | 4,38 |

L'augmentation de poids déterminée par l'addition de sulfate de calcium est sensiblement égale à la somme des augmenta-

1 Javillier. 1914, *Bull Soc. Ch. biol.*, t. I, p. 65.

tions de poids dues, d'une part à l'addition de nitrate de calcium, d'autre part à celle de sulfate de potassium. On peut remarquer que dans le cas de l'addition de nitrate de calcium l'augmentation de poids correspond très nettement à l'oxalate fixé.

## VII. — Influence de l'addition de calcium sur les cultures agées.

Tous les résultats exposés jusqu'ici se rapportent à des cultures jeunes — de quatre ou cinq jours au plus — arrêtées au maximum de développement, c'est-à-dire lorsque les mycéliums, bien fermes et élastiques, commencent à se couvrir de spores. On sait que si l'on attend plus longtemps, les mycéliums deviennent mous et visqueux, en même temps que les poids de récolte diminuent par suite de l'autolyse de la substance du champignon.

Ayant été amenée dans quelques cas à arrêter des cultures plus tardivement, alors que les spores formaient depuis un ou deux jours déjà un tapis noir uniforme à la surface du mycélium, j'ai constaté qu'en général, dans ces conditions, les différences de poids existant entre les cultures avec et sans calcium s'accentuaient, et ne pouvaient plus s'expliquer seulement par la fixation de l'oxalate de calcium, — ou par l'influence favorisante d'un excès de soufre dans le cas où le sel ajouté était un sulfate.

Voici une des expériences où cette augmentation de poids fut observée :

Culture de 6 jours ; sporulation complète depuis 2 jours ; mycéliums mous et visqueux.

Exp. XIII :

| Ca introduit dans 250 cc. de milieu | Poids sec | |
|---|---|---|
| milligrammes | grammes | grammes |
| 0 | 3,00<br>3,17 | 3,085 |
| 10 | | 3,20 |
| 25 | | 3,59 |
| 100 | | 3,90 |

L'augmentation de poids de plus de 0 gr. 8 pour la dose de 100 mgr. de Ca est bien supérieure à celle constatée dans toutes les expériences précédentes (Comparer avec les résultats réunis dans le tableau p. 92).

Peut-on admettre qu'il s'agisse là d'une influence favorisante du calcium sur le *développement* de l'Aspergillus niger ?

Si l'on suit l'évolution du mycélium aux jours successifs de la culture, comme cela a été fait dans les deux expériences suivantes, on se rend compte aisément que le calcium agit simplement *en retardant l'autolyse*.

**Exp. XIV** (1) :

| Age de la culture | Ca introduit dans 250 cc. de milieu | Poids sec | $C^2O^4Ca + H^2O$ correspondant à Ca fixé | Aspect des cultures |
|---|---|---|---|---|
| — | — | — | — | — |
| | milligrammes | grammes | milligrammes | |
| 2 jours | 0. . . . | 2,29 | » | Mycéliums minces et blancs Pas de spores. |
| | 100. . . . | 2,58 | » | |
| 3 jours | 0. . . . | 4,20 | » | Mycéliums épais et fermes. Aspect velouté dû aux conidiophores ; qq. spores noires sur les bords. |
| | 100. . . . | 4,15 | 32,1 | |
| 4 jours | 0. . . . | 4,00 | » | Mycéliums épais et fermes. Surfaces presque entièrement couvertes de spores. |
| | 100. . . . | 4,39 | 134,3 | |
| 5 jours | 0. . . . | 2,74 | » | Mycéliums mous et visqueux. Surfaces complètement couvertes d'un tapis de spores. |
| | 100. . . . | 3,68 | 234,3 | |

Ces chiffres montrent nettement que la grande différence de poids observée le 5e jour entre les cultures avec et sans calcium (0 gr. 94) doit être attribuée à ce que le poids des cultures avec calcium a diminué moins vite, par le fait de l'autolyse, que celui des cultures sans calcium.

Même constatation pour la seconde expérience, dans laquelle

1. Cette expérience XIV a été effectuée sur l'une des races d'*Aspergillus* produisant l'acide oxalique un peu plus tardivement que la race qui a servi le plus habituellement dans mes recherches. En comparant les chiffres obtenus avec ceux des expériences VII et XV par exemple, on voit que le retard dans la production d'acide est d'environ 30 heures.

le calcium a été donné sous forme, non seulement de sulfate, mais aussi de nitrate, à la dose de 100 mgr. par 250 cc. de milieu.

Voici les chiffres :

**Exp. XV :**

| Age de la culture | Nature du sel de Ca | Poids sec | $C^2O^4Ca + H^2O$ correspondant à Ca fixé | | Aspect des cultures |
|---|---|---|---|---|---|
| — | — | — | — | — | — |
| | | gr. | gr. | milligr. | |
| 3 jours | Sans Ca. | 3,98<br>3 86 | 3,92 | » | Mycéliums épais, fermes et veloutés, avec spores noires apparaissant sur les bords et sur quelques points de la surface. |
| | $SO^4Ca$. . . . . | 4,35 | | 163,5 | |
| | $(NO^3)^2Ca$ . . | 4,00 | | 198,0 | |
| 4 jours | Sans Ca. | 4,45<br>4,32 | 4,38 | » | Mycéliums très fermes. La sporulation continue. |
| | $SO^4Ca$. . . . . | 4,89 | | 286,2 | |
| | $(NO^3)^2Ca$ . . . | 4,72 | | 246 7 | |
| 5 jours | Sans Ca. | 4 26<br>4,02 | 4,14 | » | Mycéliums moins fermes. Les spores couvrent complètement toute la surface. |
| | $SO^4Ca$ . . . . | 4,62 | | 306,6 | |
| | $(NO^3)^2Ca$ . . . | 4,34 | | 292,0 | |
| 6 jours | Sans Ca. | 3,11<br>2,97 | 3,04 | » | Mycéliums mous et visqueux. Epais tapis de spores. |
| | $SO^4Ca$. . . . . | 3,97 | | 296,3 | |
| | $(NO^3)^2Ca$ . . . | 3,66 | | 319,7 | |

Comment expliquer ce *ralentissement de l'autolyse déterminé par une addition de calcium ?* Ce phénomène ne paraît pas devoir être attribué à une action directe du métal, il semble plutôt en relation avec la fixation de l'acide oxalique et aussi avec la diminution de la quantité totale d'acide oxalique constatée dans les milieux avec calcium.

Si l'on veut essayer d'établir la relativité de cause à effet entre ces différents phénomènes, on est amené à l'hypothèse suivante :

Lorsque dans le milieu de culture existe un sel de calcium, l'acide oxalique secrété normalement par le champignon est, au fur et à mesure de sa production, insolubilisé à l'état d'oxalate calcique et fixé sous cette forme par le mycélium ; il s'agit là d'une réaction chimique des plus banales, n'ayant rien à voir

avec la vie des champignons. Pourtant, par suite de cette réaction, les conditions du milieu se trouvent changées : l'acidité est plus faible, l'acide oxalique et les oxalates solubles ont disparu. Peut-être doit-on attribuer à cette modification du milieu le ralentissement de l'autolyse. Or nous verrons dans le paragraphe suivant que l'acide oxalique est produit, en partie au moins, par l'autolyse du mycélium ; ceci expliquerait donc en même temps la diminution de la quantité totale d'acide oxalique secrété, lorsque dans le milieu existe un sel de calcium. Il est bien évident que d'autres expériences sont nécessaires pour vérifier cette hypothèse.

Quoi qu'il en soit, la conclusion pratique que nous pouvons tirer de toutes ces expériences est la suivante : lorsqu'on étudie l'influence d'un élément sur la végétation, on doit être très prudent dans l'interprétation des petites augmentations de poids ; elles peuvent fort bien, comme dans le cas du calcium chez l'*Aspergillus niger*, être produites, soit par une fixation passive de matière saline, soit par un phénomène secondaire et ne pas correspondre du tout à une action favorisante directe de l'élément considéré sur la vie du végétal. Une autre indication fournie par ces résultats est la nécessité de suivre attentivement l'évolution du végétal, de noter avec soin son âge et son aspect au moment de la récolte. Beaucoup d'auteurs négligent dans leurs travaux de donner ces renseignements ; il devient alors très difficile de vérifier leurs conclusions.

## VIII. — Formation d'acide oxalique par autolyse du mycélium.

Dans tous les cas où j'ai eu à doser l'acide oxalique contenu dans les mycéliums d'*Aspergillus* cultivé sur milieu sans calcium, j'ai été amenée à faire la remarque suivante : si l'on ne fait pas l'épuisement par l'acide chlorhydrique dilué aussitôt après l'arrêt des cultures, on constate que la proportion d'acide oxalique trouvée est très notablement plus élevée que lorsqu'on

a soin d'opérer rapidement. Il semble donc que l'Aspergillus, *abandonné à lui-même en l'absence de substances nutritives, produise en s'autolysant d'assez fortes proportions d'acide oxalique.*

J'ai repris systématiquement l'étude de ce point.

Dans une première expérience, je me suis placée dans des conditions identiques à celles réalisées lorsque mon attention avait été attirée sur le phénomène. L'un des mycéliums a été traité immédiatement après l'arrêt des cultures et le lavage, tandis que les autres, lavés trois fois à l'eau distillée, puis essorés dans du papier filtre, ont été déposés dans des boîtes de Pétri fermées et laissées à la température du laboratoire. Toutes les 24 heures, l'acide oxalique a été dosé dans l'un d'eux, les résultats trouvés ont été les suivants :

**Exp. XVI :**

| Temps écoulé depuis l'arrêt des cultures | $C^2O^4H^2$ dosé dans le mycélium |
|---|---|
| heures | milligrammes |
| 0 | 35,2 |
| 24 | 82,8 |
| 48 | 143,1 |
| 72 | 158,4 |
| 96 | 178,2 |
| 120 | 203,4 |

L'oxygène jouant peut-être un rôle dans cette production d'acide oxalique, on peut se demander si le fait, pour les mycéliums, d'être dans une atmosphère confinée (boîtes de Pétri fermées) n'a pas une certaine influence sur le phénomène ; aussi ai-je recommencé l'expérience précédente en modifiant un peu le dispositif. Les mycéliums ont été mis, les uns dans des boîtes fermées, les autres dans des boîtes ouvertes. Pour empêcher la dessiccation, et rendre pour tous les mycéliums les conditions aussi semblables que possible, j'ai disposé toutes les boîtes de Pétri, fermées et ouvertes, dans les cuvettes cylindriques utilisées pour les cultures, avec au fond une mince couche d'eau ; j'ai placé ensuite le tout au thermostat à 25°.

Un *plus libre accès d'oxygène* a favorisé légèrement la production d'acide oxalique, comme le montrent les chiffres suivants :

**Exp. XVII :**

| Temps écoulé depuis l'arrêt des cultures | $C^2O^4H^2$ dosé dans le mycélium | |
|---|---|---|
| | Boîtes fermées | Boîtes ouvertes |
| heures | milligrammes | milligrammes |
| 24 | 116,1 | 123,3 |
| 72 | 195,3 | 227,0 |
| 120 | 235,6 | 273,0 |

(Aussitôt après l'arrêt des cultures, la quantité d'acide oxalique trouvée dans un mycélium était de 26 mgr. 1).

Dans toutes ces expériences, les mycéliums ayant été manipulés sans précautions spéciales, lavés à l'eau distillée ordinaire et abandonnés dans des récipients non stérilisés, on peut se demander si la formation de l'acide oxalique constatée n'est pas due à une action microbienne. J'ai donc été amenée à effectuer une nouvelle expérience en *milieu aseptique :* j'ai laissé les mycéliums dans les cuvettes stérilisées où ils avaient été cultivés, j'ai effectué les lavages à l'eau stérile en prenant toutes les précautions nécessaires pour éviter une infection. J'ai obtenu les mêmes résultats que précédemment : l'acide oxalique est donc bien élaboré par le champignon lui-même. Cette expérience montre de plus que la formation d'acide atteint très rapidement un maximum et s'y maintient. Ce dernier fait permet de considérer l'acide oxalique comme un produit d'excrétion non utilisable ultérieurement par le champignon.

**Exp. XVIII :**

| Temps écoulé depuis l'arrêt des cultures | $C^2O^4H^2$ dosé dans le mycélium |
|---|---|
| heures | milligrammes |
| 0 | 28,8 |
| 30 | 150,3 |
| 78 | 284,4 |
| 126 | 303,3 |
| 174 | 307,8 |
| 222 | 301,5 |
| 294 | 311,4 |
| 366 | 297,9 |

La quantité d'acide oxalique formée dans ces conditions diffère-t-elle de celle que produirait le mycélium si on le laissait sur le liquide où il s'est développé ? En un mot, s'agit-il là d'un phénomène spécial déterminé par les conditions particulières où se trouve le mycélium, ou est-ce simplement le processus primitif de sécrétion d'acide oxalique qui continue ?

Pour le savoir, j'ai, après trois et quatre jours de végétation sur le milieu habituel, divisé mes cultures en trois lots : dans le premier, les mycéliums ont été laissés sur le substratum où ils avaient commencé leur développement ; dans le deuxième et le troisième, j'ai enlevé avec précaution le liquide nutritif, j'ai lavé soigneusement les mycéliums à l'eau distillée stérile dans les cuvettes mêmes ayant servi aux cultures ; puis, dans la moitié des récipients (2e lot), j'ai abandonné les mycéliums sans liquide, en milieu seulement humide, tandis que dans les autres (3e lot), j'ai ajouté 250 cc. d'eau distillée stérile.

J'ai dosé l'acide oxalique des mycéliums et des substratums au bout de 4, 5 et 6 jours de culture totale. Dans les 2e et 3e séries, j'ai aussi déterminé l'acide oxalique déjà contenu dans le liquide de Raulin au moment où ce liquide avait été enlevé des cuvettes (après 3 et 4 jours de culture).

J'indique seulement dans le tableau suivant la quantité *totale* d'acide oxalique secrété dans chaque cas :

**Exp. XIX :**

1° *Acide oxalique produit par un mycélium ayant effectué tout son développement sur du liquide de Raulin (250 cc.) :*

| Culture de 4 jours | Culture de 5 jours | Culture de 6 jours |
|---|---|---|
| milligr. | milligr. | milligr. |
| 105,5 | 186,7 | 275,6 |

2° *Acide oxalique produit par un mycélium abandonné en milieu humide :*

*Après 3 jours de culture sur liquide de Raulin*

| Culture de 4 jours | Culture de 5 jours | Culture de 6 jours |
|---|---|---|
| milligr. | milligr. | milligr. |
| 116,5 | 211,3 | 281,9 |

*Après 4 jours de culture sur liquide de Raulin*

| Culture de 5 jours | Culture de 6 jours |
|---|---|
| milligr. | milligr. |
| 182,7 | 292,7 |

3° *Acide oxalique produit par un mycélium placé sur 250 cc. d'eau distillée :*

*Après 3 jours de culture sur liquide de Raulin*

| Culture de 4 jours | Culture de 5 jours | Culture de 6 jours |
|---|---|---|
| milligr. | milligr. | milligr. |
| 81,9 | 236,1 | 276,4 |

*Après 4 jours de culture sur liquide de Raulin*

| Culture de 5 jours | Culture de 6 jours |
|---|---|
| milligr. | milligr. |
| 114 | 266,6 |

On voit que la *quantité totale d'acide oxalique produite est très sensiblement la même dans tous les cas pour un même temps de culture ;* la suppression du substratum liquide n'est donc pas la cause du phénomène observé.

La légère diminution dans la production d'acide que l'on peut remarquer au début, lorsque le liquide de Raulin a été remplacé par de l'eau distillée, doit être attribuée à ce que je n'avais pas pris la précaution d'amener préalablement l'eau à la température de la culture (34°) ; elle était à la température du laboratoire très notablement inférieure. Or on sait que la température influe sur la production de l'acide oxalique (1).

De nombreuses questions se posent à propos de cette *formation d'acide oxalique par un mycélium d'*Aspergillus *abandonné sur un milieu peu ou pas nutritif.*

On peut se demander par exemple quel est le rôle joué par l'épuisement du liquide de culture. La formation d'acide oxalique coïncide-t-elle avec la disparition totale du sucre comme l'admettent certains auteurs (2), ou s'agit-il là d'un phénomène

1. Wehmer. 1891, *Ber. deut. Bot. Ges.*, t. IX, p. 163.
2. Charpentier. 1905, *C. R. Ac. Sc.*, t. CXLI, p. 367 et 429.

en relation avec l'évolution du champignon et marquant un certain état de développement ?

La sécrétion d'acide serait-elle modifiée si l'on remplaçait le liquide de Raulin en partie épuisé, non pas par de l'eau distillée — comme dans l'expérience précédente —, mais par du liquide de Raulin neuf, plus ou moins dilué, ou bien encore par une solution sucrée ou une solution saline ?

On pourrait se proposer d'étudier par ce procédé l'action d'un certain nombre de facteurs, entre autres l'influence des differents corps qui entrent dans la composition du milieu nutritif ; celle des composés calciques dont nous avons déjà entrevu le rôle dans l'autolyse ; celle de la réaction du milieu, etc.

Il serait aussi intéressant de chercher à déterminer aux dépens de quelle substance se fait cette production d'acide oxalique.

Ce sont là des questions sortant pour la plupart du cadre de ce travail, je les abandonne donc momentanément, me proposant de les reprendre plus tard pour les étudier en détail.

## IX. — Rôle antitoxique du calcium chez les végétaux inférieurs.

Osterhout (1) admet, d'après les travaux de Raulin et d'autres auteurs, que le calcium n'est pas nécessaire pour la croissance des plantes sans chlorophylle et qu'on peut se dispenser d'ajouter cet élément aux solutions nutritives destinées à ces végétaux, *à condition toutefois que ces solutions soient suffisamment diluées*. Mais, ajoute l'auteur, « si la concentration de la solution est accrue, elle devient toxique et l'addition de calcium produit alors une remarquable amélioration du développement. Le calcium, bien que n'étant pas nécessaire pour la nutrition des champignons, a pourtant une valeur protectrice pour ces végétaux comme pour les autres plantes. » Pour Osterhout, si

1. Osterhout. 1907, *Univ. of California Publ. Bot.*, t. II, n° 15, p. 317.

ce rôle protecteur n'a pas été connu plus tôt, c'est que les solutions nutritives employées étaient toujours assez diluées pour n'être pas toxiques.

N'ayant pas trouvé dans les travaux d'Osterhout de chiffres d'expériences se rapportant à cette hypothèse, j'ai effectué un certain nombre d'essais dans le but de vérifier son exactitude.

J'ai étudié l'*influence de l'addition de calcium lorsqu'on augmente, soit la concentration totale, soit celle d'un des constituants du milieu.*

On sait que les champignons présentent une grande résistance aux variations de concentration. Les chiffres donnés par Raulin, qui avait étudié ce facteur sous le titre d'*influence de la quantité d'eau* (1) montrent, qu'en multipliant par 2 ou par 3 la concentration normale du liquide de culture, on fait seulement passer le poids de la récolte de 3 gr. à 2 gr. 5 environ. Il semble bien que dans ce cas, ce ne soit pas la toxicité propre des éléments entrant dans le milieu qui interviennent, mais seulement l'augmentation de la tension osmotique. S'il en est bien ainsi, l'addition d'un sel de calcium ne devra avoir aucune influence favorisante. C'est en effet ce qu'indique l'expérience suivante dans laquelle les quantités de substances nutritives étaient les mêmes dans tous les récipients n'étant bornée, pour varier les concentrations, à changer les proportions d'eau.

**Exp. XX** :

| Ca par culture | Poids sec | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Conc. = 1 | | Conc. = 2 | | Conc. = 3 | |
| milligrammes | gr. | gr. | gr. | gr. | gr. | gr. |
| 0 | 4,51<br>4,32 | 4,42 | 3,58<br>3,45 | 3,52 | 3,38<br>3,22 | 3,30 |
| 50 | | 4,56 | | 3,45 | | 3,25 |
| 100 | | 4,87 | | 3,73 | | 3,40 |

Les expériences sur les végétaux supérieurs, exposées dans le chapitre suivant, m'ayant montré la grande toxicité des sels de magnésium et d'ammonium pour les plantes vertes et le

1. Raulin. 1870, *Thèse Paris*, p. 191.

rôle antitoxique remarquable joué par le calcium vis-à-vis de ces corps, j'ai cherché à me rendre compte si un phénomène analogue ne pourrait pas être mis en évidence chez les champignons. J'ai donc, dans le liquide de Raulin, augmenté la concentration du sulfate de magnésium et celle du nitrate d'ammonium; j'ai comparé les résultats obtenus lorsqu'on ajoute ou non un sel calcique.

Les chiffres suivants montrent qu'en multipliant par 5 et par 10 la concentration des deux sels précités, on ne fait pas baisser le poids des récoltes. Au contraire, l'addition de sulfate de magnésium agit favorablement par le soufre qu'elle introduit; c'est là une nouvelle vérification de l'action d'un excès de sulfate signalée au paragraphe VI.

Lorsque le milieu renferme un excès de nitrate d'ammonium, les mycéliums minces, parcheminés, ne sporulent pas : une addition de calcium ne modifie en rien cet aspect. On peut aussi remarquer que dans ce cas les poids de culture obtenus sont les mêmes en présence ou en l'absence de calcium. Les mycéliums n'ont donc pas fixé le métal. Ceci concorde avec le fait, signalé par Tanret (1), qu'en présence d'un excès de sels ammoniacaux, l'*Aspergillus niger* ne produit pas d'acide oxalique.

**Exp. XXI :**

| | Ca introduit dans 250 cc. du milieu — milligrammes | Poids sec — grammes | |
|---|---|---|---|
| 1° Témoins sur liquide de culture ordinaire | 0 | 3,73 | |
| | 50 | 4,17 | |
| | 100 | 4,31 | |
| | | Conc. $SO^4Mg = 5$ — grammes | Conc. $SO^4Mg = 10$ — grammes |
| 2° Augmentation de la concentration de $SO^4Mg$ | 0 | 3,91 | 3,91 |
| | 50 | 4,19 | 4,12 |
| | 100 | 4,31 | 4,16 |
| | | Conc. $NO^3NH^4 = 5$ — grammes | Conc. $NO^3NH^4 = 10$ — grammes |
| 3° Augmentation de la concentration de $NO^3NH^4$ | 0 | 3,80 | 3,77 |
| | 50 | 3,75 | 3,80 |
| | 100 | 3,98 | 3,82 |

1. Ch. Tanret. 1897, *Bull. Soc. Chim.*, 3e série, t. XVII, p. 914.

Cette expérience nous montre que pour rendre toxique le liquide de Raulin, il faut augmenter plus considérablement que nous ne l'avons fait la concentration d'une des substances nutritives qu'il renferme, et j'ajouterai que l'augmentation de concentration de tous les sels ne permet pas d'atteindre plus facilement la toxicité, — au contraire. Mazé (1) a en effet montré que si, dans le liquide de Raulin, on multiplie par 16 seulement l'élément azoté ($NO^3NH^4$), le poids de récolte est inférieur à celui que l'on obtient sur un liquide où la concentration de tous les sels a été amenée à 16 et sur le liquide de concentration 1, la proportion de sucre et l'acidité étant les mêmes dans tous les cas.

Voici les chiffres donnés par cet auteur pour une expérience :

| | | | |
|---|---|---|---|
| Concentration. . . . . | 1 | 16 | 1 + 16 Az |
| Poids du mycélium . . | 0,758 | 0,972 | 0,386 |

Utilisant ce renseignement, j'ai cultivé de l'*Aspergillus* sur les trois milieux suivants :

A : liquide de culture ordinaire ;

B : même liquide dans lequel la concentrations de sels minéraux a été portée à 15 ;

C : le poids de $NO^3NH^4$ seul a été multiplié par 15.

Dans ce dernier cas, j'ai, comme Mazé, constaté une diminution de poids de la récolte : l'addition d'un sel de calcium n'a pas atténué la toxicité de ce milieu.

Calcium sous forme de nitrate.

**Exp. XXII :**

| Ca dans 250 cc. de milieu | Poids sec du mycélium | | |
|---|---|---|---|
| | Milieu A | Milieu B | Milieu C |
| — | — | — | — |
| milligr. | grammes | grammes | grammes |
| 0 . . . . . | 3,20 | 3,56 | 2,55 |
| 50 . . . . . | 3,45 | 3,34 | 2,50 |
| 100. . . . . | 3,51 | 3,39 | 2,46 |

Le dosage du calcium dans les mycéliums a montré que si sur les milieux B et C, on ne constate aucune augmentation de

1, Mazé. 1912, *C. R. Ac. Sc.*, t. CLIV, p. 1711.

poids en présence de calcium, ce fait est bien dû, comme nous l'avons supposé, à ce que dans ces conditions le champignon ne secrétant pas d'acide oxalique ne peut plus fixer le métal.

| Ca dans 250 cc. de milieu | Poids de Ca fixé | | |
|---|---|---|---|
| | Milieu A | Milieu B | Milieu C |
| milligr. | milligr. | milligr. | milligr. |
| 50 | 37,6 | 0,4 | 0,5 |
| 100 | 68 8 | 0,4 | 0,45 |

J'ai refait ces expériences en augmentant la concentration d'autres constituants du milieu, je me suis adressée en particulier au sulfate de zinc. Là encore, je ne suis pas parvenue à diminuer la toxicité par addition d'un sel de calcium.

Toutes ces expériences montrent que l'*Aspergillus niger* est extrêmement résistant aux variations de concentration : ceci est en accord avec tout ce qu'on sait à ce sujet sur les champignons. Lorsqu'il m'a été possible de rendre le *milieu toxique*, je n'ai pas pu en *atténuer la nocivité par addition d'un sel calcique.*

## X. — Expériences sur le *Penicillium glaucum.*

J'ai vérifié une partie des résultats exposés plus haut en remplaçant l'*Aspergillus niger* par le *Penicillium glaucum.* Ce végétal m'a paru d'autant plus intéressant à étudier que Duclaux (1) le signale comme bénéficiant d'une addition de calcium, lorsqu'on le cultive sur liquide de Raulin.

Dans les expériences que j'ai effectuées sur cette moisissure, en suivant exactement la technique décrite pour l'*Aspergillus niger*, je n'ai rien observé de semblable. *Pour aucune des doses de calcium essayées, je n'ai obtenu la moindre augmentation de poids des récoltes.*

Je donne ici les chiffres de deux expériences.

La première se rapporte à l'action de petites doses de cal-

1. Duclaux. 1898, *Traité de Microbiologie*, t. III, p. 4.

cium; elle a été effectuée à l'aide de produits purifiés avec un soin tout particulier.

Calcium sous forme de sulfate.

Durée de l'expérience : 9 jours.

T = 25°.

**Exp. XXIII :**

| Ca introduit dans 250 cc. de milieu — milligr. | Poids sec — grammes | Cendres — milligr. | Ca fixé — milligr. |
|---|---|---|---|
| 0 | 3,28 | 131 | 0 |
| | 3,45 | 137 | |
| 0,25 | 3,35 | 135 | 0,15 |
| 0,5 | 3,28 | 136 | 0,2 |
| 1 | 3,26 | 136 | 0,4 |
| 2,5 | 3,07 | 133 | 1,0 |

Dans la deuxième expérience, j'ai étudié l'action de doses plus élevées ; elle comprend deux séries : dans l'une, calcium sous forme de sulfate ; dans l'autre, sous forme de nitrate.

Durée de l'expérience : 8 jours.

T = 25°.

**Exp. XXIV :**

| Ca introduit dans 250 cc. de milieu — milligr. | 1° Ca sous forme de sulfate | | |
|---|---|---|---|
| | Poids sec — grammes | Cendres — milligr. | Ca fixé — milligr. |
| 0 | 3,63 | 135 | 0,5 |
| 2,5 | 3,61 | 145 | 2,2 |
| 10 | 3,63 | 157 | 8,2 |
| 25 | 3,62 | 166 | 12,4 |
| 50 | 3,69 | 201 | 21,2 |
| 100 | 3,61 | 184 | 18,8 |

| milligr. | 2° Ca sous forme de nitrate | | |
|---|---|---|---|
| | Poids sec — grammes | Cendres — milligr. | Ca fixé — milligr. |
| 0 | 3,71 | 140 | 0,6 |
| 2,5 | 3,72 | 138 | 1,5 |
| 10 | 3,69 | 149 | 7,3 |
| 25 | 3,60 | 163 | 10,4 |
| 50 | 3,54 | 173 | 17,2 |
| 100 | 3,61 | 146 | 12,8 |

On peut remarquer qu'avec le *Penicillium*, on n'observe pas pour les fortes doses de calcium l'augmentation sensible du poids des récoltes qui a été constatée dans les cultures d'*Aspergillus*. Ce résultat est en accord avec le fait, mis en évidence par les chiffres d'analyse, que le *Penicillium* ne fixe que de faibles quantités de calcium. Ces quantités fixées sont tout à fait insuffisantes pour influer sur le poids de la plante. Elles marquent pourtant sur le poids des cendres et là encore l'augmentation de poids correspond au poids de calcium sous forme de carbonate.

Cette moindre fixation de calcium est très probablement la conséquence d'une plus faible production d'acide oxalique, comme il m'a été donné de l'observer pour certaines races d'*Aspergillus* et aussi lorsque cette moisissure est cultivée en présence de composés empêchant l'élaboration de l'acide, comme par exemple les sels ammoniacaux en excès.

---

## CHAPITRE IV

# Rôle du Calcium chez les végétaux supérieurs.

Nous avons vu que le rôle joué par le calcium chez les végétaux supérieurs paraît singulièrement complexe. Ce métal semble intervenir à la fois en tant qu'élément plastique, catalytique et antitoxique.

Malgré de très nombreux travaux sur ces différentes fonctions du calcium et la multiplicité des expériences effectuées, les données précises que nous possédons sur ce sujet sont en réalité assez restreintes : sur la plupart des points, la discussion est encore ouverte.

Le problème qui se pose est donc extrêmement vaste. Je suis loin de prétendre l'avoir résolu, il faudrait des années d'expérimentation pour arriver à ce résultat, si toutefois il est possible de l'atteindre. J'espère avoir contribué à éclaircir certains points contestés, choisis parmi ceux dont l'étude pouvait être abordée le plus aisément. J'ai laissé volontairement dans l'ombre des questions très intéressantes, comme le rôle du calcium dans le transport de l'amidon ou les relations existant dans la plante verte entre ce métal et l'acide oxalique.

## I. — Cultures en solution nutritive stérile additionnée de doses croissantes de Calcium.

*Technique.* — Le dispositif employé pour ces cultures est celui décrit par Javillier (1) et Agulhon (2) dans leurs thèses sur le rôle du zinc et du bore dans la végétation.

J'utilise des récipients d'une contenance de 1 litre ou de 500 cc., suivant le végétal expérimenté. Ce sont des flacons à fond plat en verre vert mince, pouvant supporter la stérilisation à l'autoclave. Ils sont fermés par des bouchons de liège traversés par deux tubes de verre ; l'un de ces tubes, de 1 cm. 1/2 de diamètre et de 7 à 8 cm. de longueur, est fermé à sa partie inférieure par un diaphragme de gaze destiné à recevoir la graine ; l'autre plus mince, recourbé, formant siphon, peut servir à l'introduction d'une nouvelle quantité de liquide. Le premier tube est surmonté d'un deuxième, plus large, long de 15 cm., fixé autour du premier par de l'ouate et obturé à son extrémité supérieure par un tampon de coton. Pour éviter les infections pouvant provenir des bouchons de liège difficilement stérilisables, j'ai soin de placer, en dessous de ceux-ci, un tampon d'ouate serré autour des tubes et remplissant le goulot. Le liquide nutritif une fois introduit, les bouchons sont solidement fixés au col du flacon. Après stérilisation à l'autoclave, par chauffage à 120° pendant 20 minutes, et refroidissement, les bouchons de liège sont paraffinés et les récipients sont prêts pour l'ensemencement.

J'emploie, pour la stérilisation des graines, un procédé un peu différent de celui décrit par les précédents auteurs. Le traitement par les antiseptiques puissants présente l'inconvénient de tuer beaucoup de graines, aussi je commence par une sorte de stérilisation mécanique qui consiste à agiter violemment les graines, pendant 15 à 20 minutes, avec du sable et de l'eau stériles ;

1. Javillier. *Thèse Paris*, 1908.
2. Agulhon. *Thèse Paris*, 1910.

il se produit ainsi une sorte de décapage de la surface des graines qui me permet de les traiter ensuite, seulement 5 minutes, par une solution de sublimé à 1 0/00, solution moins concentrée que celle habituellement employée ; je lave cinq ou six fois à l'eau stérile. Pour éviter les déchets provenant de la non germination des graines, je mets celles-ci germer dans des boîtes de Pétri, sur du coton hydrophile imprégné d'eau redistillée, le tout étant stérilisé. Je transporte aseptiquement, sur le milieu nutritif, seulement les graines dont la racine a déjà atteint environ 1 cm. de longueur.

Pour empêcher l'action de la lumière sur les racines, et aussi le trop grand échauffement du liquide dans le cas d'une exposition au soleil, chaque flacon est introduit dans une boîte cylindrique en carton ondulé.

Quand la partie aérienne du végétal atteint le tampon d'ouate qui ferme le tube supérieur, on enlève ce tube et on fixe la tige dans le tube intérieur à l'aide de coton stérile.

Durant les premiers jours de la végétation, les plantes sont placées à l'intérieur du laboratoire, devant une fenêtre ; elles sont ensuite transportées en plein air, sous un abri.

La solution nutritive employée, du genre de celle de Detmer ou de Knop, mais plus complexe, a la composition suivante :

| | Milligrammes |
|---|---|
| Nitrate d'ammonium . . . . . | 500 |
| Nitrate de potassium . . . . . | 500 |
| Phosphate acide de potassium . . . | 500 |
| Sulfate de magnésium. . . . . | 250 |
| Alun de potassium. . . . . | 100 |
| Sulfate de fer ammoniacal . . . . | 20 |
| Sulfate de manganèse. . . . . | 4 |
| Chlorure de sodium . . . . . | 50 |
| Iodure de potassium . . . . . | 1 |
| Silicate de potassium . . . . . | 100 |
| Sulfate de zinc . . . . . | 1 |
| Eau redistillée . . . . . .q. s. pour 1 litre | |

Dans les flacons qui doivent renfermer le calcium, j'ajoute

des quantités convenables du sel choisi. Je prépare plusieurs flacons pour chaque dose, afin de faire porter les observations, dans chaque série, sur un certain nombre de plants.

**Expérience sur le Pois.** — Une difficulté se présente lorsqu'on veut cultiver des légumineuses en milieu stérile ; il est à craindre que, malgré la présence de nitrates, les plantes ne souffrent de l'absence des bactéridies qui jouent le rôle important que l'on sait dans la fixation de l'azote chez les légumineuses. Pour prévenir cet inconvénient, j'ai tenté des essais d'inoculation en diminuant en même temps de moitié la dose des nitrates. On sait en effet, depuis les recherches de Marchal (1), que ces sels nuisent au développement des bactéridies.

J'ai opéré de la façon suivante : j'ai d'abord isolé et cultivé, sur du bouillon de haricot sucré, des bactéridies provenant de nodosités de pois ; puis avant de transporter les plantules sur le milieu nutritif, je les ai plongées dans une culture pure de bactéridies.

Des flacons témoins, contenant la dose entière de nitrates, ont été ensemencés avec des graines n'ayant pas subi ce traitement.

Ces essais d'inoculation n'ont donné aucun résultat : il n'est pas apparu de nodosités sur les racines et le liquide est resté clair ; sans doute la proportion de nitrate, bien que diminuée, s'est trouvée encore trop considérable pour permettre le développement des bactéridies.

Malgré cet échec, j'ai obtenu des plants de pois vigoureux, tout à fait comparables dans la série ayant subi une tentative d'inoculation et dans celle n'ayant pas été traitée.

L'ensemencement a été effectué le 1er juillet et les cultures arrêtées le 12 août.

Le calcium a été introduit sous forme de carbonate.

Contenance des récipients : 500 cc.

Les chiffres donnés sont les moyennes des mesures faites sur plusieurs plants.

1. Marchal. 1901, *C. R. Ac. Sc.*, t. CXXXIII, p. 1032.

**PLANCHE I. — Culture en solution nutritive stérile additionnée de doses croissantes d'un sel de calcium.**

*En haut :* Après 3 semaines de végétation.
*En bas :* Après 6 semaines de végétation.

La planche I montre l'aspect des cultures après 3 et 6 semaines de végétation.

| Ca par litre de liquide nutritif — milligrammes | Poids frais moyen — Tige + feuilles — grammes | Racine — grammes | Plante totale — grammes |
|---|---|---|---|
| 0 | 0,107 | 0,073 | 0,180 |
| 10 | 0,647 | 0,268 | 0,915 |
| 20 | 1,871 | 0,539 | 2,410 |
| 100 | 2,906 | 0,786 | 3,692 |
| 200 | 3,633 | 1,120 | 4,753 |
| 500 | 3,510 | 0,864 | 4,374 |

| milligr. | Poids sec moyen — Tige + feuilles — milligr. | Racine — milligr. | Plante totale — milligr. |
|---|---|---|---|
| 0 | 10,5 | 8 | 18,5 |
| 10 | 72 | 36 | 108 |
| 20 | 196 | 59 | 255 |
| 100 | 341 | 93 | 434 |
| 200 | 429 | 104 | 533 |
| 500 | 376 | 98 | 474 |

Etant données la composition chimique du milieu et les autres conditions de l'expérience (température, éclairement), on peut conclure que :

1° *La solution nutritive employée est très nettement toxique en l'absence de calcium ;* le développement y est en effet bien inférieur à celui obtenu dans de l'eau redistillée, ainsi qu'on peut s'en assurer en comparant les chiffres précédents à ceux de toutes les expériences suivantes qui comportent des témoins sur eau redistillée.

2° *Le meilleur développement du végétal correspond à la dose de 200 mgr. de calcium par litre* (= 500 mgr. de $CO^3Ca$).

J'ai aussi déterminé le poids des cendres et le calcium fixé par le végétal ; voici les chiffres :

| Ca par litre de liquide nutritif | Cendres | | |
|---|---|---|---|
| | Tige + feuilles | Racine | Plante totale |
| milligr. | milligr. | milligr. | milligr. |
| 0 | » | » | 2,5 |
| 10 | » | » | 8,5 |
| 20 | 28,5 | 9,7 | 38,2 |
| 100 | 47,0 | 13,5 | 60,5 |
| 200 | 59,5 | 18,5 | 78,0 |
| 500 | 56,0 | 16,0 | 62,0 |

| | Ca fixé | | | $CO^3Ca$ % du poids des cendres |
|---|---|---|---|---|
| | Tige + feuilles | Racine | Plante totale | |
| milligr. | milligr. | milligr. | milligr. | 0/0 |
| 0 | » | » | 0,05 | 5 |
| 10 | » | » | 0,2 | 5,9 |
| 20 | 0,9 | 0,2 | 1,1 | 7,2 |
| 100 | 2,3 | 0,5 | 2,8 | 11,5 |
| 200 | 3,15 | 0,65 | 3,8 | 12,2 |
| 500 | 3 | 0,7 | 3.7 | 12,8 |

Les quantités de calcium fixées sont très faibles et toujours bien inférieures à celles existant dans le milieu ; si on les rapporte au poids des cendres en les exprimant en $CO^3Ca$ (en effet, dans les cendres recarbonatées, le calcium se trouve à l'état de carbonate), on voit que la proportion augmente régulièrement avec la teneur du milieu en calcium.

**Expériences sur d'autres végétaux.** — Des expériences analogues effectuées sur le *maïs* et le *blé* m'ont permis de vérifier que ces deux végétaux sont *beaucoup moins sensibles que le pois à l'action toxique du milieu sans calcium*. Ils ont pourtant *besoin de calcium* pour achever leur développement ; mais ils semblent commencer à souffrir seulement lorsque la réserve de calcium de la graine est épuisée après avoir servi à la formation de nouveaux organes, en particulier des feuilles. Nous reviendrons plus loin sur ces faits.

## II. — Rôle antitoxique du Calcium.

L'expérience sur le *pois* nous a montré que dans un milieu nutritif sans calcium, la plante ne souffre pas seulement de l'absence d'un aliment nécessaire, mais que ce milieu incomplet est toxique pour elle, puisqu'elle s'y développe moins bien que dans l'eau redistillée : l'addition d'un sel de calcium supprime cette action nocive.

J'ai cherché à préciser *ce rôle antitoxique du calcium.*

Connaissant, au début de mes recherches, surtout les travaux de Lœw sur la toxicité du magnésium en l'absence de calcium, j'ai été tout d'abord amenée à attribuer à ce métal seul la toxicité du milieu.

Lœw (1) et Osterhout (2) ayant prétendu qu'aux concentrations où ils existent dans les milieux de culture genre Knop, les autres éléments ne sont pas nuisibles, je ne m'en suis pas occupée dans mes premières expériences.

Pourtant, le milieu incomplet employé étant acide par suite de la présence de phosphate acide de potassium, j'ai voulu savoir quelle était l'influence de la neutralisation du milieu produite par l'addition du carbonate de calcium.

Mes premiers essais ont donc porté sur l'action du sulfate de magnésium et du phosphate acide de potassium.

Plus tard, j'ai été amenée comme je l'expliquerai, à remplacer le carbonate de calcium par le sulfate et à étudier les autres constituants du milieu.

*Technique.* — Comme il s'agit de déterminer l'action de corps pris séparément, on ne peut pas obtenir un développement complet du végétal ; il faut se contenter d'observer les premiers stades de la croissance, alors que la plante vit surtout aux

1. Lœw. 1908, *Bot. Gaz.*, t. XLVIV, p. 302.
2. Osterhout. 1909, *Bot. Gaz.*, t. XLVII, p. 148.

dépens des réserves de sa graine. Les résultats doivent être comparés à ceux que l'on obtient lorsque la plante se développe dans l'eau redistillée.

Craignant que le traitement que l'on fait subir aux graines pour les stériliser (lavage aux antiseptiques) ne fausse les résultats, j'ai opéré, sauf dans un cas, en milieu non stérile ; mais un certain nombre de précautions très simples m'ont permis d'éviter complètement le développement des moisissures et de retarder beaucoup celui des bactéries. Ces précautions consistent, par exemple, à laver les récipients servant aux cultures à l'eau bouillante, à agiter les graines dans de l'eau stérile renouvelée deux ou trois fois, à les transporter avec des pinces flambées, etc.

Toutes mes expériences, sauf la première en milieu stérile, ont été effectuées dans des récipients cylindriques d'une contenance double de la quantité de liquide qui doit y être introduite ; ils ne sont donc remplis qu'à mi-hauteur. Les graines (6 ou 8 par récipient) sont disposées sur un petit support en verre, suspendu au niveau du liquide par des agrafes d'aluminium. Un couvercle de verre, maintenu à un demi-centimètre au-dessus du bord du récipient, empêche l'évaporation trop rapide du liquide, la chute des poussières, sans pourtant s'opposer au renouvellement de l'air.

Afin d'éviter les déchets, je mets les graines à germer dans de l'eau redistillée et je transporte, sur le milieu à étudier, seulement celles présentant déjà une racine d'un centimètre environ.

J'arrête en général mes expériences lorsque les jeunes plantes placées sur un milieu toxique sont mortes ou que leur développement a nettement cessé depuis deux ou trois jours.

Dans toutes ces expériences, les doses introduites sont celles indiquées dans la formule de la solution nutritive employée pour les cultures en milieu synthétique (voir page 111). Lorsque j'étudie plusieurs sels d'un même métal, je calcule le poids de substance à introduire dans un volume donné de liquide, de façon à avoir partout la même concentration en métal. Pour le

calcium, la dose choisie a été de 500 mgr. de carbonate ou de sulfate de calcium par litre. Je rappelle que c'est cette dose qui a donné les meilleurs résultats dans les cultures en milieu synthétique.

Dans les tableaux qui suivent, j'indiquerai donc la nature des sels étudiés sans rappeler leur concentration.

1° **Expériences sur le Pois.** — Dans une *première expérience*, la seule effectuée en milieu stérile, je n'ai pas employé le dispositif que je viens de décrire ; je me suis servi des flacons stérilisables utilisés pour les cultures en milieu complet ; un tube de verre de 7 à 8 cm. de longueur et de 1 cm. 1/2 de diamètre, muni à la base d'un diaphragme de gaze et fermé à sa partie supérieure par de l'ouate, a été simplement maintenu dans le goulot par un tampon de coton. Les graines préalablement stérilisées et ayant commencé à germer sur de l'eau redistillée ont été transportées aseptiquement dans ces tubes, de façon à ce que la petite racine, traversant le diaphragme de gaze, vienne plonger dans le liquide que contient le flacon. Trois flacons ont été préparés pour chaque milieu.

Durée de l'expérience : 18 jours.

Les chiffres du tableau ci-dessous représentent la moyenne des mesures faites sur trois plants cultivés dans des conditions identiques.

| Nature du milieu | Longueur moyenne | | |
|---|---|---|---|
| | Tige | Racine | Plante totale |
| | millim. | millim. | millim. |
| Eau redistillée. . . . | 75 | 140 | 215 |
| $SO^4Mg$ . . . . . | 27 | 18 | 45 |
| $PO^4H^2K$. . . . . | 37 | 45 | 82 |
| $CO^3Ca$ . . . . . | 140 | 240 | 380 |
| $CO^3Ca + SO^4Mg$ . . . | 162 | 220 | 382 |
| » $+ PO^4H^2K$. . . | 110 | 286 | 396 |

Les différences observées ne portent pas seulementsur la longueur, mais aussi sur l'aspect du végétal ; les racines, par suite de leur contact direct avec le liquide sont surtout modifiées ; celles sur sulfate de magnésium sont brunes et comme rongées ;

celles sur phosphate acide de potassium sont jaunes, courtes et trapues ; sur les autres milieux, elles sont au contraire blanches, longues et déliées

Cette expérience montre très nettement que :

1° *le sulfate de magnésium et le phosphate acide de potassium sont toxiques aux doses où ils existent dans la solution nutritive ;*

2° *une addition de carbonate de calcium supprime cette action nocive.* On peut remarquer que l'on obtient le même développement du végétal lorsque le carbonate de calcium est seul ou lorsqu'il est mélangé avec l'un des deux sels toxiques.

Toutes les expériences qui suivent, sur le pois et les autres végétaux, ont été effectuées en milieu non stérile, d'après la technique décrite au début de ce paragraphe.

2e *expérience.* — J'ai recommencé dans ces nouvelles conditions l'expérience précédente en employant comme *sels de calcium*, non seulement le *carbonate*, mais aussi le *sulfate*, dans les deux cas à la dose de 500 mgr. par litre.

J'ai obtenu des résultats absolument identiques à ceux donnés par l'expérience en milieu stérile. Le sulfate de calcium a agi de la même façon que le carbonate ; il s'est simplement montré un peu plus favorable que ce dernier sel, grâce sans doute à sa plus grande solubilité.

Le sulfate et le carbonate de calcium produisant le même effet vis-à-vis du phosphate acide de potassium, il ne pouvait plus être question d'attribuer la toxicité de ce sel à son acidité, mais bien à l'influence du métal.

3e *expérience.* — J'ai démontré l'exactitude de cette supposition en étudiant non seulement l'action du phosphate acide de potassium, mais aussi celle du phosphate neutre (obtenu en neutralisant le phosphate acide par la potasse en présence de phtaléine) et celle du sulfate de potassium.

Les chiffres suivants établissent que *tous les sels de potassium*, qu'ils soient acides ou neutres, *sont toxiques* et que *leur toxicité est supprimée par l'addition d'un sel de calcium.*

Durée de l'expérience : 12 jours.

Les chiffres donnés sont la moyenne des mesures faites sur 7 plants pour chaque milieu.

| Nature du milieu | Longueur moyenne | | |
|---|---|---|---|
| | Tige | Racine | Plante totale |
| | millim. | millim. | millim. |
| Eau redistillée. . . . | 42 | 65 | 107 |
| $PO^4H^2K$. . . . . | 33 | 40 | 73 |
| $PO^4HK^2$. . . . . | 28 | 28 | 56 |
| $SO^4K^2$ . . . . . | 27 | 33 | 60 |
| $SO^4Ca$ . . . . . | 150 | 215 | 365 |
| $SO^4Ca + PO^4H^2K$. . . | 143 | 240 | 383 |
| » $+ PO^4HK^2$. . . | 148 | 230 | 378 |
| » $+ SO^4K^2$ . . . | 139 | 237 | 376 |

4e *expérience.* — Dans les expériences précédentes, je me suis contentée d'apprécier l'effet du milieu en mesurant la *longueur de la plante* ; on peut objecter à ceci que la hauteur du végétal n'est pas toujours en relation avec l'état de son développement, — par exemple, dans le cas des plantes étiolées —. J'ai donc dans de nouveaux essais déterminé non seulement la longueur des différentes parties de la plante, mais aussi le *poids frais* et le *poids sec.*

Les chiffres obtenus montrent que toutes ces mesures varient parallèlement : il est donc permis de conclure qu'il s'agit bien là d'une action sur le développement et non pas simplement sur la forme du végétal.

Durée de l'expérience : 12 jours.

6 plants par milieu.

La planche II (en haut) montre l'aspect des cultures au moment de la récolte.

| Nature du milieu | Longueur moyenne | | |
|---|---|---|---|
| | Tige | Racine | Plante totale |
| | millim. | millim. | millim. |
| Eau redistillée. . . . | 34 | 96 | 130 |
| $SO^4Mg$ . . . . . | 12 | 8 | 20 |
| $PO^4H^2K$ . . . . . | 22 | 46 | 68 |
| $SO^4K^2$ . . . . . | 23 | 33 | 56 |
| $SO^4Ca$ . . . . . | 85 | 217 | 302 |
| $SO^4Ca + SO^4Mg$ . . . | 90 | 238 | 328 |
| » $+ PO^4H^2K$. . . | 91 | 226 | 317 |
| » $+ SO^4K^2$ . . . | 86 | 236 | 322 |

| | Poids frais moyen | | |
|---|---|---|---|
| | Tige | Racine | Plante totale |
| | — milligr. | — milligr. | — milligr. |
| Eau redistillée. . . . | 216 | 81 | 297 |
| $SO^4Mg$ . . . . . | » | » | 93 |
| $PO^4H^2K$ . . . . . | 140 | 65 | 205 |
| $SO^4K^2$ . . . . . | 156 | 60 | 216 |
| $SO^4Ca$ . . . . . | 575 | 151 | 726 |
| $SO^4Ca + SO^4Mg$ . . . | 576 | 115 | 691 |
| » $+ PO^4H^2K$ . . . | 581 | 96 | 677 |
| » $+ SO^4H^2$ . . . | 518 | 105 | 623 |

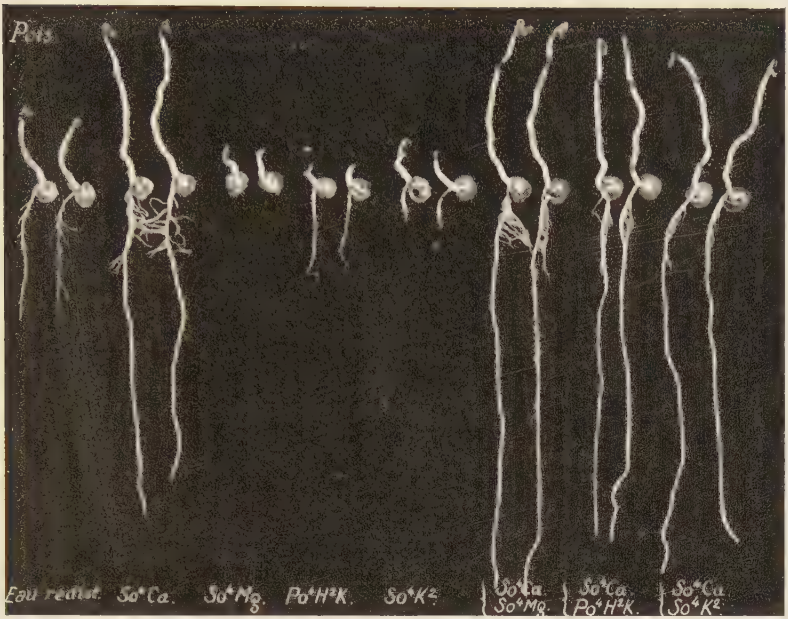
| | Poids sec moyen | | |
|---|---|---|---|
| | Tige | Racine | Plante totale |
| | — milligr. | — milligr. | — milligr. |
| Eau redistillée. . . . | 18,5 | 10,5 | 29,0 |
| $SO^4Mg$ . . . . . | » | » | 17,6 |
| $PO^4H^2K$ . . . . . | 10,5 | 8,1 | 18,6 |
| $SO^4K^2$ . . . . . | 16,3 | 7,3 | 23,6 |
| $SO^4Ca$ . . . . . | 47,6 | 16,6 | 64,2 |
| $SO^4Ca + SO^4Mg$ . . . | 45,3 | 17,0 | 62,3 |
| » $+ PO^4H^2K$ . . . | 45,5 | 12,8 | 58,3 |
| » $+ SO^4K^2$ . . . | 42,8 | 14,7 | 57,5 |

Toutes ces expériences établissent clairement, non seulement la *toxicité du magnésium*, mais aussi celle du *potassium* à la concentration où ce métal existe dans les milieux nutritifs habituellement employés. Cela est en contradiction avec l'opinion de Lœw et d'Osterhout, nous en verrons plus loin la raison.

*Le calcium présente vis-à-vis du potassium les mêmes propriétés antitoxiques que vis-à-vis du magnésium.* L'antagonisme existant entre le calcium et le magnésium n'est donc pas particulier à ces deux corps comme le voudrait la théorie de Lœw.

5e *expérience.* — Je me suis proposée d'étendre aux autres constituants du milieu nutritif les recherches effectuées sur les sels de magnésium et de potassium. J'ai étudié en particulier les *sels ammoniacaux*. On sait que Maquenne et Demoussy (1) ont

1. Maquenne et Demoussy. 1910, *C. R. Ac. Sc.*, t. CLI, p. 178.



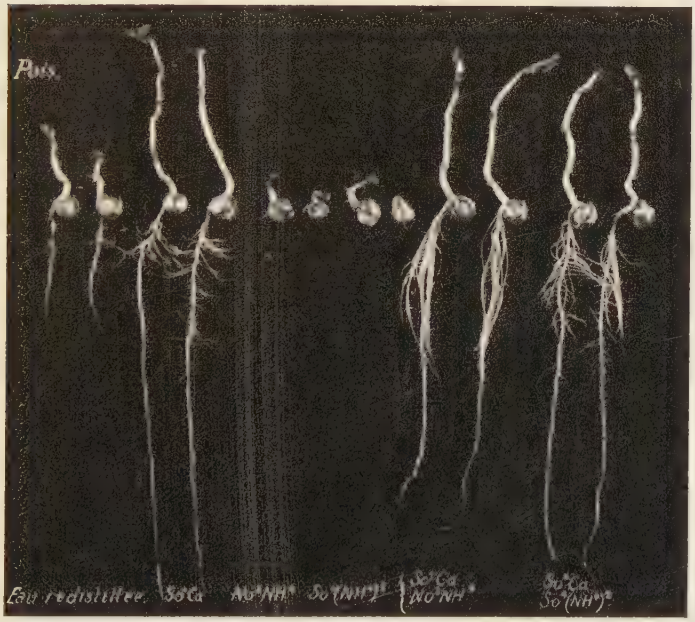




**PLANCHE II. — Rôle antitoxique des sels de calcium vis-à-vis de différents sels nutritifs.**

*En haut :* Sels de magnésium et de potassium.
*En bas :* Sels d'ammonium.

signalé la grande toxicité de ces sels à l'égard des feuilles vertes. Mes essais prouvent que *ces sels sont aussi très nocifs* pour les graines en voie de germination et pour les jeunes plantes. J'ai établi qu'*une addition de calcium supprime cet effet nuisible*, de la même façon qu'elle neutralise celui des sels magnésiens et potassiques.

Voici les chiffres obtenus :

Durée de l'expérience : 12 jours.

8 plants par milieu.

La planche II (en bas) montre l'aspect des cultures au moment de la récolte.

| Nature du milieu | Longueur moyenne | | |
|---|---|---|---|
| | Tige | Racine | Plante totale |
| | — millim. | — millim. | — millim. |
| Eau redistillée. . . | 34 | 67 | 101 |
| $NO^3NH^4$. . . . . | $<5$ | $<5$ | $<10$ |
| $SO^4(NH^4)^2$ . . . . . | $<5$ | $<5$ | $<10$ |
| $SO^4Ca$ . . . . . | 81 | 257 | 308 |
| $SO^4Ca + NO^3NH^4$. . . | 82 | 160 | 242 |
| » $+ SO^4(NH^4)^2$ . . | 72 | 180 | 252 |

| | Poids frais moyen | | |
|---|---|---|---|
| | Tige | Racine | Plante totale |
| | — milligr. | — milligr. | — milligr. |
| Eau redistillée. . . . | 183 | 97 | 280 |
| $NO^3NH^4$. . . . . | » | » | 50 |
| $SO^4(NH^4)^2$ . . . . . | » | » | 50 |
| $SO^4Ca$ . . . . . | 477 | 200 | 677 |
| $SO^4Ca + NO^3NH^4$. . . | 517 | 280 | 797 |
| » $+ SO^4(NH^4)^2$ . . | 476 | 241 | 717 |

| | Poids sec moyen | | |
|---|---|---|---|
| | Tige | Racine | Plante totale |
| | — milligr. | — milligr. | — milligr. |
| Eau redistillée. . . . | 16,2 | 11 | 27,2 |
| $NO^3NH^4$. . . . . | » | » | 13,5 |
| $SO^4(NH^4)^2$ . . . . . | » | » | 13,7 |
| $SO^4Ca$ . . . . . | 38,7 | 18 | 56,7 |
| $SO^2Ca + NO^3NH^4$. . . | 39,6 | 20 | 59,6 |
| » $+ SO^4(NH^4)^2$ . . | 36,0 | 19 | 55,0 |

Lorsqu'on examine les chiffres de ce tableau, on remarque que l'introduction d'un nitrate ou d'un sel d'ammonium dans le liquide de culture renfermant déjà un sel calcique détermine une diminution de longueur de la racine principale, comparativement à ce qu'on obtient en présence du sel de calcium seul ; mais les poids secs de récolte obtenus sont les mêmes, la diminution de longueur de la racine étant compensée par un développement plus considérable des radicelles, ainsi qu'on peut s'en rendre compte par l'examen de la planche II.

Les mesures effectuées dans tous les essais précédents montrent que l'on observe sensiblement la même croissance que les plantes se soient développées en présence d'*un sel de calcium seul* ou sur *le mélange d'un sel de calcium avec d'autres sels nutritifs*, tels que ceux de *magnésium*, de *potassium* ou d'*ammonium*. Il semble donc que ces derniers sels jouent un rôle nul ou très peu important durant les premières phases du développement de la plante ; les réserves de la graine en ces métaux paraissent suffisantes pour assurer le début de l'évolution.

6e *expérience.* — J'ai obtenu une confirmation de ces faits en cultivant, pendant un temps un peu plus long que dans les expériences précédentes, des plantules de pois sur des sels de calcium seuls et sur des mélanges de ces sels avec ceux de magnésium, de potassium ou d'ammonium.

J'ai utilisé comme sels calciques témoins, non seulement le sulfate, mais aussi le nitrate, afin de mettre en évidence la diminution de longueur des racines déterminée par la présence d'un sel azoté (nitrate ou sel ammoniacal).

Durée de l'expérience : 20 jours.

8 plants par milieu.

| Nature du milieu | Longueur moyenne | | |
|---|---|---|---|
| | Tige | Racine | Plante totale |
| | millim. | millim. | millim. |
| $SO^4Ca$ . . . . . | 195 | 235 | 430 |
| » . . . . . | 182 | 249 | 431 |
| $(NO^3)^2Ca$ . . . . . | 196 | 181 | 377 |
| $SO^4Ca + SO^4Mg$ . . . | 223 | 240 | 463 |
| » $+ PO^4H^2K$ . . . | 191 | 272 | 463 |
| » $+ SO^4K^2$ . . . | 207 | 205 | 412 |
| » $+ NO^3NH^4$ . . . | 198 | 182 | 380 |
| » $+ SO^4(NH^4)^2$ . . | 119 | 197 | 316 |

| | Poids frais moyen | | |
|---|---|---|---|
| | Tige | Racine | Plante totale |
| | milligr. | milligr. | grammes |
| $SO^4Ca$ . . . . . | 882 | 200 | 1,082 |
| » . . . . . | 805 | 205 | 1,010 |
| $(NO^3)^2Ca$ . . . . . | 1.116 | 241 | 1,357 |
| $SO^4Ca + SO^4Mg$ . . . | 1.120 | 223 | 1,343 |
| » $+ PO^4H^2K$ . . . | 895 | 193 | 1,088 |
| » $+ SO^4K^2$ . . . | 936 | 216 | 1,152 |
| » $+ NO^3NH^4$ . . . | 950 | 373 | 1,323 |
| » $+ SO^4(NH^4)^2$ . . | 516 | 250 | 0,766 |

| | Poids sec moyen | | |
|---|---|---|---|
| | Tige | Racine | Plante totale |
| | milligr. | milligr. | milligr. |
| $SO^4Ca$ . . . . . | 63,7 | 19,7 | 83,4 |
| » . . . . . | 61,3 | 21,8 | 83,1 |
| $(NO^3)^2Ca$ . . . . . | 63,5 | 20,1 | 83,6 |
| $SO^4Ca + SO^4Mg$ . . . | 69,6 | 22,1 | 91,7 |
| » $+ PO^4H^2K$ . . . | 61,6 | 20,6 | 82,2 |
| » $+ SO^4K^2$ . . . | 66,7 | 18,3 | 85,0 |
| » $+ NO^3NH^4$ . . . | 68,6 | 25,1 | 93,7 |
| » $+ SO^4(NH^4)^2$ . . | 50,2 | 20,8 | 71,0 |

Après 20 jours de végétation, seule l'addition de sulfate de magnésium ou de nitrate d'ammonium au sel calcique paraît avoir déterminé une légère augmentation du poids sec de la récolte ; le sulfate d'ammonium a un effet nocif.

7e *expérience.* — Le rôle antitoxique du calcium semble s'exercer encore vis-à-vis de substances autres que celles que nous avons signalées jusqu'à présent.

Les recherches de Dehérain et Demoussy (1), celles de Coupin (2) ont montré que lorsqu'on essaie de cultiver de jeunes plantes dans de l'*eau qui a été distillée dans un appareil en cuivre étamé* (celle que l'on emploie le plus habituellement dans les laboratoires), le développement du végétal s'arrête, cette eau ayant été rendue extrêmement toxique par les traces métalliques qu'elle a entraînées. Une addition de calcium supprime en partie cette toxicité comme le prouve l'expérience suivante.

Durée de l'expérience : 12 jours.

8 plants par milieu.

La planche III montre l'aspect des plantes récoltées.

| Nature du milieu | Longueur moyenne | | |
|---|---|---|---|
| | Tige | Racine | Plante totale |
| | millim. | millim. | millim. |
| Eau redistillée. . . . | 32 | 57 | 89 |
| » + $SO^4Ca$. | 70 | 201 | 271 |
| Eau distillée ord. . . . | 21 | 16 | 37 |
| » + $SO^4Ca$. | 56 | 37 | 93 |

On peut remarquer qu'il ne s'agit pas là d'une neutralisation complète de l'action nocive comme dans le cas des sels de magnésium, de potassium ou d'ammonium. Les racines dans l'eau distillée ordinaire additionnée d'un sel de calcium présentent encore un aspect anormal. Peut-être dans ce cas n'a-t-on pas le droit de parler vraiment d'une action antitoxique, mais seulement d'une influence favorisante du calcium sur la germination se faisant sentir *malgré* la présence de substances toxiques.

2° **Expériences sur le Lupin blanc et le Lupin jaune.** — J'ai recommencé les plus importantes des expériences précédentes sur deux espèces de lupin.

1. Dehérain et Demoussy. 1901, *C. R. Ac. Sc.*, t. LXXXII, p. 523.
2. Coupin. 1901, *C. R. Ac. Sc.*, t. LXXXII, p. 645.

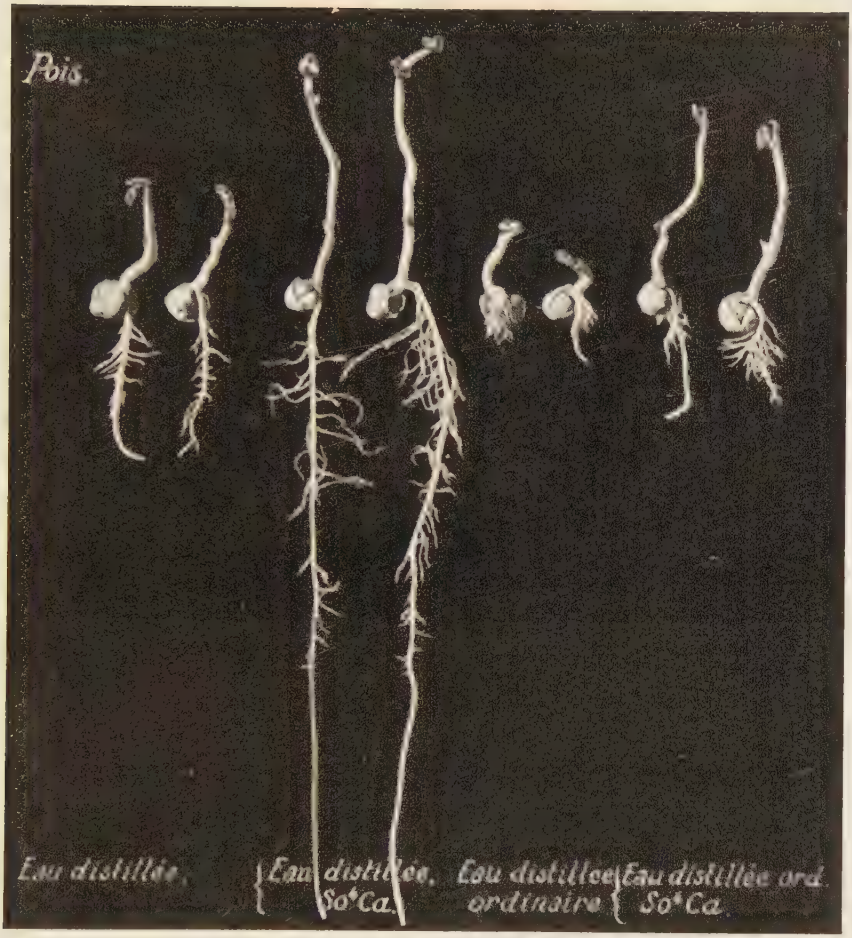



PLANCHE III. — Toxicité de l'eau distillée ordinaire.
Influence de l'addition d'un sel de calcium.

(Dans la moitié gauche de la figure, au lieu d'eau distillée, lire eau redistillée).

Ces plantes présentent la particularité d'être *calcifuges*, surtout le lupin jaune. Aussi m'a-t-il paru intéressant de déterminer :

1° Si les sels nutritifs, en l'absence de calcium, sont toxiques pour elles comme ils le sont pour le pois ;

2° Si ces plantes réputées calcifuges bénéficient, comme les calcicoles et les indifférentes, d'une addition de calcium au milieu de culture.

*Expériences sur le Lupin blanc.* — Comme pour le pois, j'ai été amenée à étudier d'abord la toxicité des sels de magnésium et de potassium, puis ensuite celle des sels ammoniacaux.

Durée de chaque expérience : 10 jours.

Dans chacun des cas : 6 plants par milieu.

1° *Toxicité des sels de magnésium et de potassium.*

| Nature du milieu | Longueur moyenne | | |
|---|---|---|---|
| | Axe hypocot. | Racine | Plante totale |
| | millim. | millim. | millim. |
| Eau redistillée. . . . | 21 | 56 | 77 |
| $SO^4Mg$ . . . . . | $<5$ | $<5$ | $<10$ |
| $PO^4H^2K$ . . . . . | $<5$ | $<5$ | $<10$ |
| $SO^4K^2$ . . . . . | $<5$ | $<5$ | $<10$ |
| $SO^4Ca$ . . . . . | 81 | 126 | 207 |
| $SO^4Ca + SO^4Mg$ . . . | 76 | 149 | 225 |
| » $+ PO^4H^2K$ . . . | 75 | 126 | 201 |
| » $+ SO^4K^2$ . . . | 75 | 153 | 228 |

2° *Toxicité des sels ammoniacaux*

| Nature du milieu | Longueur moyenne | | |
|---|---|---|---|
| | Axe hypocot. | Racine | Plante totale |
| | millim. | millim. | millim. |
| Eau redistillée. . . . | 18 | 54 | 72 |
| $NO^3NH^4$. . . . . | $<5$ | $<5$ | $<10$ |
| $SO^4(NH^4)^2$ . . . . . | $<5$ | $<5$ | $<10$ |
| $SO^4Ca$ . . . . . | 48 | 101 | 149 |
| $SO^4Ca + NO^3NH^4$. . . | 52 | 88 | 140 |
| » $+ SO^4(NH^4)^2$ . . | 57 | 101 | 158 |

Nous retrouvons ici tous les faits déjà constatés avec le pois :

1° *Toxicité des sels de magnésium, de potassium et d'ammonium introduits seuls dans le milieu à la concentration où ils existent dans les solutions nutritives habituellement employées ;*

2° *Rôle antitoxique du calcium vis-à-vis de ces sels.*

Le lupin blanc paraît même être tout particulièrement sensible aux actions toxiques ; ses racines sont attaquées et rongées aussitôt qu'elles touchent le liquide renfermant un des sels nocifs ; même les sels de potassium arrêtent dès le début tout développement alors que pour le pois l'effet nocif de ces mêmes sels est très peu marqué.

*Expérience sur le Lupin jaune.* — J'ai essayé, non seulement l'effet des sels de magnésium, de potassium et d'ammonium employés seuls et en présence de calcium, mais aussi celui du mélange des trois premiers sels.

Durée de l'expérience : 10 jours.

4 à 6 plants par milieu.

(Les graines de lupin jaune germent très difficilement ; les plantules obtenues se développent mal ; il est malaisé d'obtenir avec ce végétal des résultats aussi réguliers qu'avec les autres plantes étudiées).

| Nature du milieu | Longueur moyenne | | |
|---|---|---|---|
| | Axe hypocot. | Racine | Plante totale |
| | millim. | millim. | millim. |
| Eau redistillée . . . . | 49 | 26 | 75 |
| $SO^4Mg$ . . . . . | 21 | 8 | 29 |
| $PO^4H^2K$ . . . . . | 42 | 17 | 59 |
| $NO^3NH^4$ . . . . . | 23 | 8 | 31 |
| $SO^4Ca$ . . . . . | 71 | 35 | 106 |
| $SO^4Ca + SO^4Mg$ . . . . | 55 | 37 | 92 |
| » $+ PO^4H^2K$ . . . | 55 | 42 | 97 |
| » $+ NO^3NH^4$ . . . | 63 | 37 | 100 |
| $SO^4Mg + PO^4H^2K + NO^3NH^4$ | 39 | 11 | 50 |

Ces chiffres montrent que le *lupin jaune, bien que très nettement calcifuge, se comporte de la même façon que le pois et le lupin blanc.* Au point de vue de la résistance aux actions toxiques, le lupin jaune paraît même se rapprocher plus du pois que du lupin blanc.

La toxicité du mélange des trois sels nocifs paraît être la moyenne entre les toxicités de chacun d'eux.

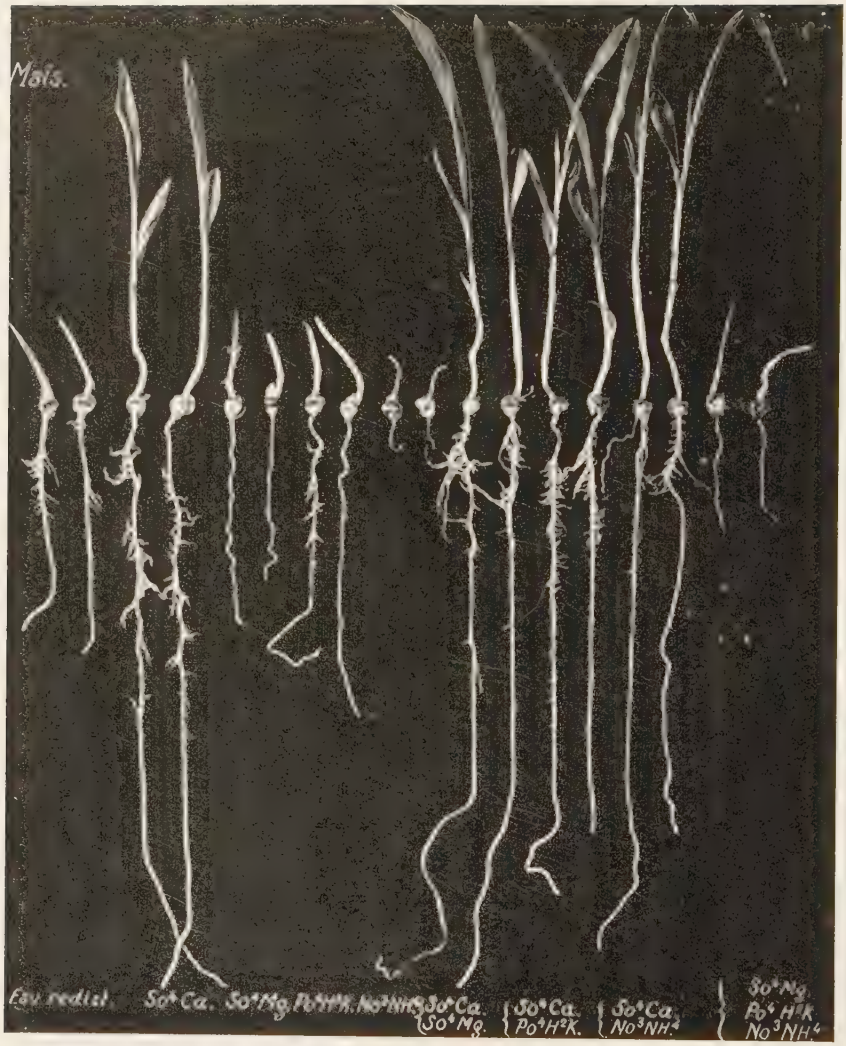



PLANCHE IV. — Rôle antitoxique des sels de calcium vis-à-vis des sels de magnésium, de potassium et d'ammonium.

3° **Expériences sur le Maïs et le Blé.** — Nous avons vu déjà que ces deux végétaux cultivés en milieu synthétique liquide paraissent *peu sensibles à l'action nocive du milieu sans calcium;* ils semblent souffrir surtout de *l'absence de calcium comme aliment.*

L'étude de la toxicité des différents sels nutritifs pris séparément a confirmé cette opinion.

*Expérience sur le maïs.* — Les chiffres suivants montrent que pour le maïs, aux concentrations où ces sels existent dans le milieu de culture, le phosphate acide de potassium n'est pas toxique, le sulfate de magnésium l'est très légèrement; seul, le nitrate d'ammonium paraît franchement nocif. Enfin, le mélange des trois sels n'est pas toxique et il est probable que dans ce cas, c'est le sel de potassium qui joue le rôle d'antitoxique vis-à-vis des deux autres.

Durée de l'expérience : 14 jours.

5 à 6 plants par milieu.

La planche IV montre l'aspect des cultures au moment de la récolte.

| Nature du milieu | Longueur moyenne | | |
|---|---|---|---|
| | Tige + feuilles | Racine | Plante totale |
| — | — | — | — |
| | millim. | millim. | millim. |
| Eau redistillée . . . . | 46 | 99 | 145 |
| $SO^4Mg$ . . . . . | 39 | 66 | 105 |
| $PO^4H^2K$ . . . . . | 47 | 121 | 168 |
| $NO^4NH^4$ . . . . . | 25 | 22 | 47 |
| $SO^4Ca$ . . . . . | 157 | 300 | 457 |
| $SO^4Ca + SO^4Mg$ . . . . | 196 | 322 | 528 |
| » $+ PO^4H^2K$ . . . | 172 | 216 | 388 |
| » $+ NO^3NH^4$ . . . | 206 | 210 | 416 |
| $SO^4Mg + PO^4H^2K + NO^3NH^4$ | 50 | 71 | 121 |

1re *expérience sur le blé.* — Le blé semble être encore plus résistant que le maïs à l'action toxique des sels nutritifs ; les sels ammoniacaux eux-mêmes paraissent, aux concentrations étudiées, à peu près inoffensifs.

En voici deux exemples ; il s'agit de deux essais effectués à une année d'intervalle : afin d'éviter les répétitions inutiles, je me contente, pour le second essai, d'indiquer la longueur totale du végétal ; mais il me paraît intéressant de rapprocher les nombres obtenus dans les deux cas, afin de mettre en évidence la constance des résultats pour des cultures faites à des dates éloignées.

Durée de chaque expérience : 14 jours.

Dans chacun des cas : 5 plants par milieu.

| Nature du milieu | Longueur moyenne — 1er essai — Tige + feuilles | Racine | Plante totale | 2e essai — Plante totale |
|---|---|---|---|---|
| | millim. | millim. | millim. | millim. |
| Eau redistillée . . . . | 113 | 54 | 167 | 164 |
| $SO^4Mg$ . . . . . | 84 | 26 | 110 | 165 |
| $PO^4H^2K$ . . . . . | 132 | 50 | 182 | 170 |
| $SO^4K^2$ . . . . . | 117 | 49 | 166 | |
| $NO^3NH^4$ . . . . . | 93 | 27 | 120 | 146 |
| $SO^4(NH^4)^2$. . . . . | 99 | 27 | 126 | |
| $SO^4Ca$ . . . . . | 143 | 185 | 328 | 338 |
| $SO^4Ca + SO^4Mg$ . . . . | 132 | 212 | 344 | 352 |
| » $+ PO^4H^2K$ . . . | 167 | 111 | 278 | 322 |
| » $+ SO^4K^2$ . . . . | 156 | 134 | 290 | |
| » $+ NO^3NH^4$ . . . | 140 | 63 | 203 | 225 |
| » $+ SO^4(NH^4)^2$. . . | 116 | 86 | 202 | |
| $SO^4Mg + PO^4H^2K + NO^3NH^4$ | 143 | 37 | 180 | 213 |

On obtient sensiblement les mêmes chiffres pour les plantes cultivées soit dans l'eau redistillée, soit en présence des sels magnésiens ou potassiques seuls ; les différences en moins dans le cas des sels ammoniacaux sont faibles ; il n'y a donc pas lieu de parler ici d'un rôle antitoxique du calcium, puisqu'aux doses introduites, les sels étudiés sont peu ou pas nuisibles.

On peut remarquer de plus que, contrairement à ce qui a été observé pour les autres végétaux, le mélange des trois sels de magnésium, de potassium et d'ammonium, non seulement n'est pas toxique, mais encore favorise légèrement la croissance du blé.

2e *expérience sur le blé.* — Si l'on augmente la concentration des sels de magnésium, de potassium et d'ammonium, on peut arriver à atteindre la dose nocive et à mettre en évidence le rôle antitoxique du calcium.

Dans cette expérience, j'ai *quadruplé* les doses des trois premiers sels, mais j'ai conservé la même teneur en calcium.

Durée de l'expérience : 14 jours.

5 plants par milieu.

| Nature du milieu | Longueur moyenne | | |
|---|---|---|---|
| | Tige + feuilles | Racine | Plante totale |
| | millim. | millim. | millim. |
| Eau redistillée . . . . | 141 | 77 | 218 |
| $SO^4Mg$ . . . . . | 96 | 25 | 121 |
| $SO^4K^2$ . . . . . | 140 | 52 | 192 |
| $SO^4(NH^4)^2$ . . . . . | 80 | 10 | 90 |
| $SO^4Ca$ . . . . . | 151 | 229 | 380 |
| $SO^4Ca + SO^4Mg$ . . . . | 148 | 206 | 354 |
| » $+ SO^4K^2$ . . . . | 172 | 161 | 333 |
| » $+ SO^4(NH^4)^2$. . . | 96 | 61 | 157 |
| $SO^4Mg + SO^4K^2 + SO^4(NH^4)^2$ | 147 | 33 | 180 |

La toxicité du magnésium et celle de l'ammonium apparaissent nettement, mais celle du potassium est encore très faible.

La proportion de calcium ajoutée, suffisante pour supprimer l'action nocive des deux premiers métaux, ne neutralise plus celle de l'ammonium ; l'équilibre entre les deux éléments, réalisé dans les autres expériences, n'est pas atteint ici.

*Le maïs et le blé se comportent donc, au point de vue qualitatif, de la même façon que le pois, le lupin blanc et le lupin jaune, mais au point de vue quantitatif, on observe des différences assez sensibles.*

Ces variations dans la manière de réagir de divers végétaux montrent le danger que présente la généralisation des résultats obtenus avec une espèce déterminée. Le blé en particulier a été fréquemment choisi comme matériel d'étude (Coupin, Osterhout, etc.) ; sa résistance aux actions toxiques en fait cependant un assez mauvais réactif.

4° **Expérience sur le Lin.** — Les sels minéraux pouvant jouer un rôle dans l'utilisation des réserves de la graine par la jeune plante, j'ai voulu vérifier les résultats précédents sur une *graine oléagineuse*; j'ai expérimenté sur le lin.

Voici du reste, d'après André (1), la composition centésimale moyenne des graines employées dans mes essais :

| Graines | Eau | Substances azotées | Corps gras | Substances hydro-carbonées | Cendres |
|---|---|---|---|---|---|
| Pois . . . | 13 à 14 | 21 à 24 | 1,5 à 2,3 | 45 à 54 | 2,1 à 3,5 |
| Lupin. . . | 10 à 14 | 35 à 40 | 4 à 6 | 25 à 28 | 2,8 à 4 |
| Blé . . . . | 11 à 15 | 9 à 14 | 1,5 à 2 | 68 à 72 | 1,5 à 2,6 |
| Maïs . . . | 9 à 14 | 9 à 11 | 4 à 5 | 66 à 73 | 1,5 à 2,5 |
| Lin. . . . | 9 à 10 | 21 à 25 | 34 à 38 | 20 à 25 | 4 à 5 |

Ce tableau montre que pois et lupin d'une part, blé et maïs, d'autre part, diffèrent par leur teneur relative en substances azotées et en hydrates de carbone ; le lin se distingue des végétaux précédents par sa richesse en corps gras. Pourtant les chiffres suivants indiquent que le lin ne se comporte pas différemment des autres espèces étudiées, il se rapproche beaucoup, par sa façon de réagir, du pois et du lupin jaune. *Il ne faut donc pas chercher dans la nature des réserves, la raison des différences observées entre les divers végétaux.*

Durée de l'expérience : 14 jours.

6 à 10 plants par milieu.

| Nature du milieu | Longueur moyenne | | |
|---|---|---|---|
| | Axe hypocot. | Racine | Plante totale |
| | millim. | millim. | millim. |
| Eau redistillée . . . . | 50 | 51 | 101 |
| $SO^4Mg$ . . . . . | 31 | 0 | 31 |
| $PO^4H^2K$ . . . . . | 34 | 16 | 50 |
| $NO^3NH^4$ . . . . . | 31 | 5 | 36 |
| $SO^4Ca$ . . . . . | 65 | 103 | 168 |
| $SO^4Ca + SO^4Mg$ . . . . | 54 | 107 | 161 |
| » $+ PO^4H^2K$ . . . | 68 | 78 | 146 |
| » $+ NO^3NH^4$ . . . | 41 | 86 | 127 |
| $SO^4Mg + PO^4H^2K + NO^3NH^4$ | 35 | 18 | 53 |

Pour le lin, on peut remarquer que l'action, soit toxique, soit favorisante, se fait surtout sentir sur la racine.

1. André. 1909, *Chimie agricole : chimie végétale*, p. 267.

*
* *

Si nous résumons les résultats obtenus, nous voyons que, *qualitativement*, toutes les plantes étudiées se comportent de la même manière : *les sels de magnésium, de potassium, d'ammonium sont toxiques pour elles ; les sels de calcium neutralisent cette toxicité*. Mais, *quantitativement*, ces divers végétaux se distinguent les uns des autres par *une résistance plus ou moins grande aux actions toxiques*.

A quelles causes attribuer ces différences ?

Est-ce à des variations dans la constitution des protoplasmes les rendant plus ou moins sensibles à l'influence des sels nocifs, certains protoplasmes présentant une sorte d'immunité naturelle, d'autres étant au contraire très fragiles ? Ou bien faut-il admettre la présence dans la graine de substances protectrices neutralisant le principe nuisible au fur et à mesure de sa pénétration ? Enfin s'agit-il simplement de différences dans le pouvoir d'absorption des sels nutritifs, les végétaux résistants étant ceux dont la membrane ne laisse passer que difficilement les corps existant dans le milieu extérieur ?

Chacune de ces explications peut être admise suivant les cas. C'est ainsi que la résistance des végétaux inférieurs à de très fortes doses de substances extrêmement nocives pour les plantes supérieures est très probablement en rapport avec une constitution particulière du protoplasme. Par contre, les variations de sensibilité, seulement quantitatives, que l'on observe entre les divers végétaux supérieurs me semblent plutôt devoir être attribuées à des différences dans le *pouvoir d'absorption*. Nous en verrons plus loin un exemple à propos des plantes calcifuges.

Les études se rapportant au mécanisme de l'absorption des sels par les racines présentent donc un intérêt tout particulier.

Je citerai entre autres sur ce sujet les travaux de Demoussy (1) et ceux de Rufz de Lavison (2).

Le premier a montré que les plantes sont capables de faire un choix entre les différentes substances qui lui sont offertes : si on fournit au végétal à la fois du potassium et du calcium, la racine puise dans le mélange environ deux fois et demi plus de potassium que de calcium ; en présence de sodium et de calcium, la plante absorbe indifféremment l'un ou l'autre corps ; au contraire, dans un mélange de potassium et de sodium, elle prend le potassium et laisse le sodium.

Les recherches de Rufz de Lavison sont encore plus intéressantes au point de vue qui nous occupe. Cet auteur a établi que les sels minéraux, au point de vue de leur pénétration dans la racine, se divise en deux catégories :

Les uns ne passent que par la cellulose et ne peuvent traverser le protoplasme ; ils sont arrêtés dans la racine par les cadres subérisés de l'endoderme. Pour pénétrer plus loin, il faut qu'ils subissent une transformation, peut-être une sorte d'assimilation.

Les autres sont au contraire capables de traverser le protoplasme et de passer ainsi directement dans le cylindre central. Pourtant, ils subissent dans l'endoderme une sorte de filtration dont l'intensité dépend à la fois de la *nature de la plante*, de celle du composé dont on étudie la pénétration, et enfin de l'état dans lequel se trouve le protoplasme de l'endoderme au moment de l'expérience.

C'est sans doute dans des faits de cette nature que l'on trouvera l'explication des différences quantitatives constatées dans la résistance des divers végétaux à l'action toxique des sels.

1. Demoussy. 1898. *C. R. Ac. Sc.*, t. CXXVII. p. 970.

2. Rufz de Lavison. 1910, *Rev. gén. Bot.*, t. XXII, p. 225 ; 1911, *id.*, t. XXIII, p. 177 ; 1911. *Ann. Sc. nat. Bot.*, 9e série, t. XIV, p. 97.

### III. — Influence favorisante du Calcium sur la germination.

Toutes les expériences décrites dans le paragraphe précédent mettent nettement en évidence le fait suivant : tandis que les sels de magnésium, de potassium et d'ammonium sont nuisibles à la dose employée, ceux de *calcium*, introduits isolément dans le milieu à une concentration analogue, *favorisent* au contraire *très notablement la croissance de la jeune plante.*

Nous avons vu, dans la partie historique de ce travail, que cette influence favorisante du calcium sur la germination a été signalée depuis longtemps par plusieurs auteurs. Mais à l'époque où ces premières recherches ont été effectuées, on utilisait pour les témoins de l'eau distillée ordinaire ; des expériences plus récentes ayant établi la nocivité de cette eau, la nécessité de réviser tous les résultats antérieurs s'est imposée.

Mes essais effectués avec de l'eau redistillée dans un appareil de verre venant confirmer les conclusions des premiers expérimentateurs, le rôle utile joué par le calcium au début du développement du végétal semble bien devoir être admis. Pourtant, il m'a paru nécessaire d'en établir encore plus solidement la réalité.

On peut en effet se demander si l'eau redistillée employée, bien que dépourvue de par son mode de préparation de traces de métaux lourds, ne renferme pas d'autres produits toxiques neutralisables par une addition de calcium. S'il en était ainsi, l'action améliorante observée serait accidentelle et ne présenterait pas d'intérêt au point de vue physiologique.

J'ai été amenée à cette supposition en remarquant que l'appareil que j'emploie pour redistiller l'eau, étant muni de bouchons de caoutchouc, communique parfois à l'eau une odeur particulière et que, dans ce cas, le développement du végétal est influencé défavorablement. Cette toxicité due à des produits

volatils n'a rien qui doive nous surprendre depuis les travaux de Mirande (1), de Griffon (2) et de Gatin (3) sur ce sujet.

J'ai donc comparé les résultats obtenus en utilisant soit l'eau habituelle, soit une eau préparée dans un appareil complètement en verre supprimant par conséquent cette cause d'erreur.

Ces essais m'ont permis de conclure avec certitude que, dans les conditions de température et d'éclairement de mes expériences, *le calcium agit favorablement sur la germination ;* en effet la jeune plante croît toujours plus vigoureusement dans un milieu additionné d'une dose convenable d'un sel de ce métal que dans l'eau *pure*.

Mais dans des expériences de cet ordre, il faut se méfier non seulement des produits toxiques introduits dans l'eau distillée par l'emploi d'un appareil métallique, mais aussi de ceux *volatils* cédés dans un appareil de verre par les bouchons et les jointures en caoutchouc. Les sels de calcium se sont du reste montrés, dans une certaine mesure, antitoxiques vis-à-vis de ces substances comme vis-à-vis des sels minéraux.

Toutes mes expériences sur le rôle utile du calcium ont été effectuée à la *température ordinaire* (15 à 20°). On sait que Dehérain et Bréal (4) ont cru démontrer que l'action favorisante du calcium disparaît lorsque la température est suffisamment élevée. En été ou en hiver dans une enceinte à 30-35°, ils ont obtenu le même développement des plantules, soit dans l'eau distillée, soit en présence d'un sel de calcium.

En recommençant ces expériences, je n'ai pas retrouvé les faits signalés par ces auteurs. Du reste leurs résultats avaient déjà été contredits par d'autres expérimentateurs (5).

Les variations de l'*éclairement* ne paraissent pas non plus agir sensiblement sur le phénomène observé.

1. Mirande. 1910, *C. R. Ac. Sc.*, t. CLI, p. 481 et 949 ; 1911, *C. R. Ac. Sc.*, t. CLII, p. 204.

2. Griffon. 1910, *C. R. Ac. Sc.*, t. CLI, p. 1070.

3. Gatin. 1911, *C. R. Ac. Sc.*, t. CLIII, p. 202 et 688 ; 1912. *Ann. Sc. naturelles Bot.* 9e série, t. XIV, p. 97.

4. Dehérain et Demoussy. 1883, *Ann. Agron.*, t. IX, p. 58.

5. Portheim. 1901, *Sitzb. d. K. Akad. d. Wiss. Wien.*, t. CX, p. 113.

En résumé, *quels que soient la température et l'éclairement, je constate toujours une amélioration du développement lorsque le milieu renferme un sel de calcium.*

Il reste maintenant à déterminer *la cause de cette action favorisante du calcium.*

Ce métal agit-il simplement comme le ferait n'importe quelle autre substance non nuisible capable d'augmenter la tension osmotique du milieu ? Cela semble fort peu probable, car on sait que les végétaux peuvent supporter, sans en souffrir, d'assez grandes variations de pression. Nous verrons par exemple dans le paragraphe suivant que, chez la plupart des plantes, le développement est le même pour des concentrations du milieu en calcium variant de $\frac{1}{10000}$ à $\frac{5}{1000}$.

Doit-on attribuer l'action favorisante du calcium à ce que la graine étant en général pauvre en cet élément, la pénétration d'une certaine quantité de ce métal venant de l'extérieur est nécessaire pour rétablir l'équilibre ? Pour le savoir, il faudrait expérimenter sur des graines plus riches relativement en calcium que celles qui ont été étudiées ; le haricot blanc, ou mieux encore la betterave, le pavot ou le chanvre pourraient fournir à cet égard un bon matériel de recherche.

Ou bien s'agit-il d'une action spécifique du calcium sur certaines réactions vitales : transport des substances de réserve, comme l'ont admis Bœhm et Groom ; neutralisation de l'acide oxalique nuisible, ainsi que le veut par exemple Schimper ; construction de la membrane, comme le font supposer nos connaissances sur les composés pectiques et la pectase ; formation des noyaux et des corps chlorophylliens, ainsi que l'affirme Lœw ?

Pour répondre à ces questions, de nombreuses expériences sont encore nécessaires.

## IV. — Courbe d'action du Calcium sur la végétation, en rapport avec sa concentration dans le milieu.

La dose de sel de calcium choisie dans toutes les expériences précédentes — d'après les résultats donnés par les cultures en milieu complet — a été de 500 mgr. de sulfate par litre. Elle correspond, nous l'avons vu, à une action nettement favorisante aussi bien sur la germination que sur le développement total.

Qu'arrive-t-il si l'on diminue ou si l'on augmente cette dose? En un mot quelle est la courbe d'action du calcium sur la végétation, lorsque ce métal est seul présent dans le substratum?

Nous savons que tous les sels minéraux peuvent devenir toxiques si l'on élève suffisamment leur concentration. Pour quelle teneur du milieu en calcium, peut-on constater les premiers effets nuisibles?

Plusieurs auteurs ont déjà cherché à comparer la toxicité des divers sels de calcium entre eux ou avec les sels d'autres métaux, par rapport à un même végétal, — le plus souvent le blé, comme par exemple dans les expériences de Coupin (1).

Il m'a paru intéressant d'envisager autrement la question et de mettre en parallèle, non plus des sels variés, mais des végétaux différents au point de vue de l'action d'un même sel introduit dans le substratum à diverses concentrations. Cette étude se rattache directement à celle des plantes *calcicoles* et *calcifuges* sur laquelle nous reviendrons avec plus de détails dans le paragraphe suivant.

Le sulfate de calcium ayant une solubilité trop faible pour se prêter à des recherches sur l'action des doses élevées, j'ai remplacé ce sel par le nitrate ; dans un cas, j'ai essayé aussi le chlorure.

**1° Expériences sur le Pois.** — J'ai étudié parallèlement l'action de doses croissantes de nitrate et de chlorure de cal-

1. Coupin, 1900, *C. R. Ac. Sc.*, t. CXXX, p. 791 ; 1901, *id.*, t. CXXXII, p. 645.

cium. Les poids moléculaires de ces deux sels étant voisins [$(NO^3)^2 Ca + 4 H^2O = 236$ ; $Ca Cl^2 + 6 H^2O = 219$], la proportion de métal qui correspond à des poids égaux de chacun d'eux est comparable.

Durée de l'expérience : 12 jours.

Les mesures ont porté sur 8 plants pour chaque dose.

La planche V (en haut) représente des plants de pois cultivés en présence de doses croissantes de nitrate de calcium.

| $(NO^3)^2Ca$ par litre | Longueur moyenne | | |
|---|---|---|---|
| | Tige | Racine | Plante totale |
| gr. | millim. | millim. | millim. |
| 0 | 43 | 70 | 113 |
| 0,1 | 63 | 98 | 161 |
| 0,5 | 73 | 130 | 203 |
| 1 | 77 | 120 | 197 |
| 2 | 71 | 146 | 217 |
| 5 | 54 | 102 | 156 |
| 10 | 44 | 59 | 103 |
| 20 | 21 | 41 | 62 |
| 50 | 0 | 0 | 0 |

| $CaCl^2$ par litre | Longueur moyenne | | |
|---|---|---|---|
| | Tige | Racine | Plante totale |
| gr. | millim. | millim. | millim. |
| 0 | 42 | 70 | 112 |
| 0,1 | 91 | 147 | 238 |
| 0,5 | 87 | 126 | 213 |
| 1 | 94 | 131 | 225 |
| 2 | 85 | 152 | 237 |
| 5 | 70 | 140 | 210 |
| 10 | 44 | 102 | 146 |
| 20 | 11 | 47 | 58 |
| 50 | 5 | 33 | 38 |

On voit que, dans les conditions où j'expérimente, le nitrate et le chlorure de calcium se comportent sensiblement de la même façon au point de vue de leur action sur le développement du pois.

**2° Expérience sur le Lupin blanc et le Lupin jaune.** — J'ai étudié parallèlement ces deux espèces qui sont, surtout la

dernière, considérées comme *calcifuges*. Il était donc tout particulièrement intéressant de déterminer pour elles l'influence de doses variées de sels de calcium.

L'expérience a duré 10 jours ; j'ai récolté 5 à 6 plants par récipient.

La planche V (en bas) permet de comparer l'aspect des deux végétaux suivant la richesse du milieu en calcium.

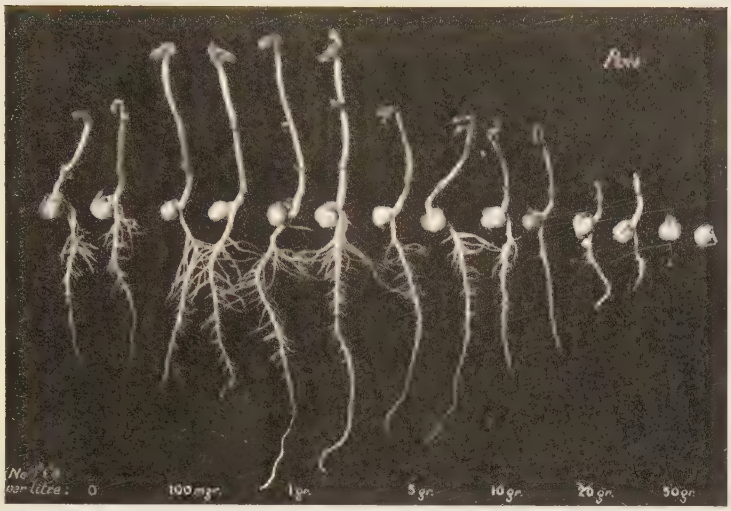
*Lupin blanc.*

| $(NO^3)^2Ca$ par litre | Longueur moyenne | | |
|---|---|---|---|
| | Axe hypocot. | Racine | Plante totale |
| gr. | millim. | millim. | millim. |
| 0 | 24 | 68 | 82 |
| 0,1 | 52 | 123 | 175 |
| 0,5 | 56 | 138 | 194 |
| 1 | 47 | 135 | 182 |
| 2 | 47 | 128 | 175 |
| 5 | 36 | 139 | 175 |
| 10 | 22 | 47 | 59 |
| 20 | 10 | 21 | 31 |
| 50 | 9 | 12 | 21 |

*Lupin jaune.*

| $(NO^3)^2Ca$ par litre | Longueur moyenne | | |
|---|---|---|---|
| | Axe hypocot. | Racine | Plante totale |
| gr | millim | millim. | millim. |
| 0 | 38 | 21 | 59 |
| 0,1 | 60 | 52 | 112 |
| 0,5 | 54 | 52 | 106 |
| 1 | 43 | 36 | 79 |
| 2 | 46 | 40 | 86 |
| 5 | 26 | 31 | 57 |
| 10 | 11 | 16 | 27 |
| 20 | 8 | 11 | 19 |
| 50 | 0 | 0 | 0 |

En comparant les résultats obtenus avec le pois, le lupin blanc et le lupin jaune, on voit que les différences existant entre le lupin blanc et le lupin jaune sont beaucoup plus marquées que celles que l'on constate entre le lupin blanc et le pois. Pour ces deux derniers végétaux, la courbe d'action du calcium est à peu près identique. L'optimum et l'apparition de



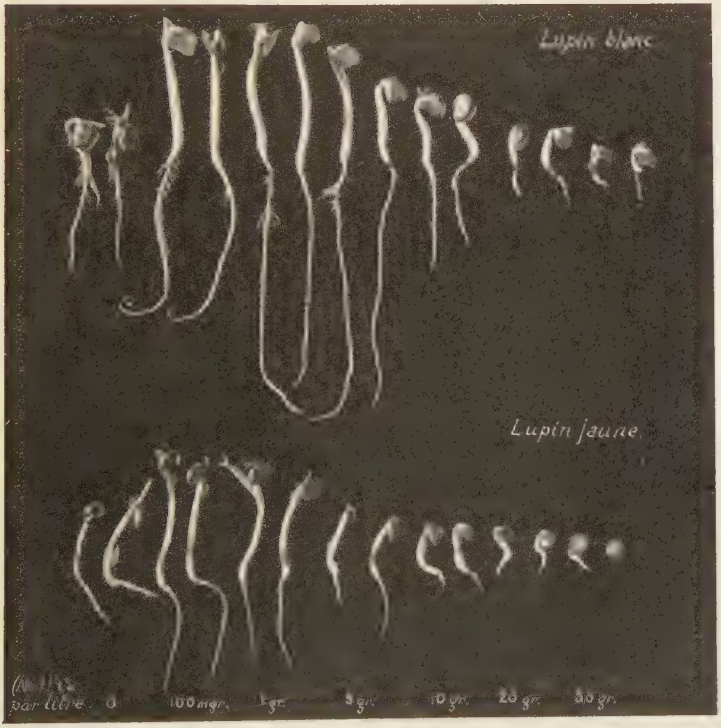




PLANCHE V. — Influence de doses croissantes de nitrate de calcium sur différents végétaux.

la toxicité correspondent à des doses très sensiblement plus faibles pour le lupin jaune, ce qui est bien en accord avec sa réputation de calcifuge.

3° **Expérience sur le Blé.** — Le blé s'est montré tout particulièrement résistant à l'action toxique des sels de magnésium, potassium, ammonium introduits isolément dans le milieu. Présente-t-il la même résistance vis-à-vis des sels de calcium ?

Durée de l'expérience : 14 jours.

6 plants par milieu.

| $(NO^3)^2Ca$ par litre | Longueur moyenne | | |
|---|---|---|---|
| | Tige+feuilles | Racine | Plante totale |
| gr. | millim. | millim. | millim. |
| 0 | 143 | 52 | 195 |
| 0,1 | 190 | 103 | 293 |
| 0,5 | 181 | 62 | 243 |
| 1 | 180 | 70 | 250 |
| 2 | 167 | 65 | 221 |
| 5 | 160 | 48 | 208 |
| 10 | 161 | 51 | 212 |
| 20 | 127 | 38 | 165 |
| 50 | 15 | 15 | 30 |

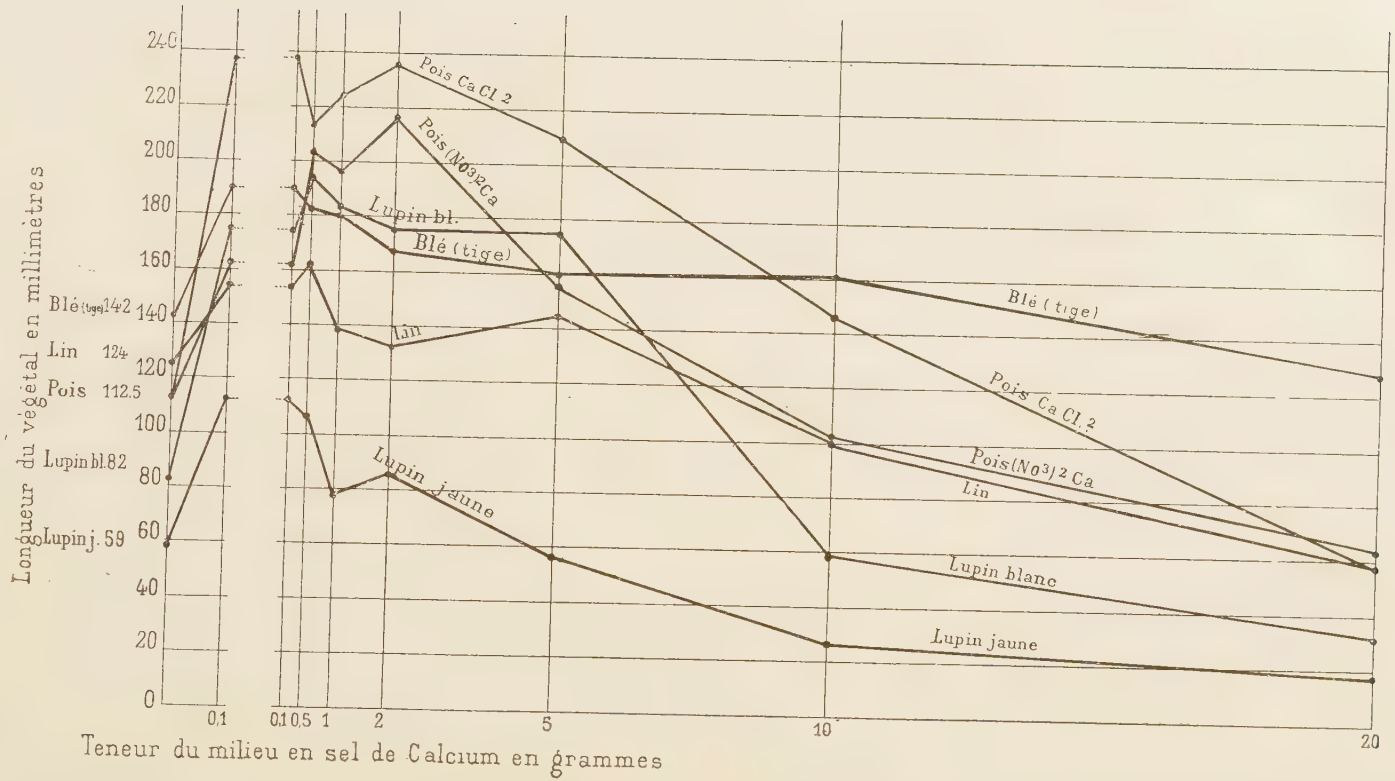
Dans cet essai, il faut considérer de préférence la longueur des tiges ; car les nitrates agissent sur les racines du blé surtout en augmentant leur nombre sans qu'il y ait une action sensible sur l'allongement.

En tenant compte de ce fait, on voit que le blé paraît supporter des doses de calcium supérieures à celles tolérées par les autres végétaux expérimentés.

4° **Expérience sur le Lin.** — La nature des réserves de la graine influe-t-elle sur la courbe d'action du calcium ?

Durée de l'expérience : 14 jours.

Plants récoltés : 8 à 10 par milieu.




**Courbes d'action du calcium sur la croissance de différents végétaux, en rapport avec la concentration du métal dans le milieu.**

[Dans la partie gauche de la figure, pour les teneurs inférieures à 0 gr. 1, l'échelle des poids est 10 fois plus grande que dans la partie droite : 0 gr. 1 à 20 grammes].

| $(NO^3)^2Ca$ par litre | Longueur moyenne | | |
|---|---|---|---|
| | Axe hypocot. | Racine | Plante totale |
| gr. | millim. | millim. | millim. |
| 0 . . . . . | 71 | 53 | 124 |
| 0,1. . . . . | 82 | 72 | 154 |
| 0,5. . . . . | 83 | 78 | 161 |
| 1 . . . . . | 76 | 63 | 139 |
| 2 . . . . . | 69 | 63 | 132 |
| 5 . . . . . | 67 | 79 | 146 |
| 10 . . . . . | 52 | 50 | 102 |
| 20 . . . . . | 41 | 17 | 58 |
| 50 . . . . . | 0 | 4 | 4 |

Ces chiffres montrent nettement que l'action du calcium sur le lin est analogue à celle de ce métal sur les autres végétaux.

Tous ces résultats sont résumés par des courbes (p. 140) qui permettent de comparer l'influence de doses croissantes de calcium sur les différentes espèces expérimentées.

En ne tenant pas compte des irrégularités difficiles à éviter lorsqu'on opère sur du matériel vivant, on peut formuler les conclusions suivantes :

1° L'*optimum* correspond à des doses variant : pour le *blé*, de 0 gr. 1 à 10 gr. de sel de calcium par litre ; pour le *pois*, le *lupin blanc* et le *lin*, de 0 gr. 1 à 5 gr. ; pour le *lupin jaune*, de 0 gr. 1 à 0 gr. 5.

2° Si, conventionnellement, on choisit comme *limite inférieure de toxicité* la dose de sel de calcium pour laquelle le développement est le même que dans l'eau redistillée, on voit que cette limite est comprise entre 10 et 20 gr. pour le *blé*, au voisinage de 10 gr. pour le *pois*, entre 5 et 10 gr. pour le *lupin blanc* et le *lin*, à 5 gr. pour le *lupin jaune*.

Malheureusement ces expériences sont encore très incomplètes ; il y aurait lieu de préciser les résultats obtenus en essayant des doses intermédiaires, en particulier celles inférieures à 100 mgr. pour avoir quelques données sur le début de la courbe, et celles comprises entre 5 gr. et 20 gr., afin de pouvoir déterminer avec plus d'exactitude la concentration pour laquelle apparaît la toxicité.

## V. — Fixation du Calcium par les plantes calcifuges.

Les expériences que je viens d'exposer permettent de déterminer la courbe d'action du calcium par rapport à la *teneur du milieu* en cet élément.

Quels sont les résultats que l'on obtient lorsqu'on cherche à établir cette courbe, non plus d'après la proportion de calcium existant dans le substratum, mais d'après celle *fixée* par le végétal ?

Nous savons déjà que tous les végétaux ne se comportent pas de la même manière au point de vue de cette fixation ; ceux dits *calcifuges* se distinguent des autres par la propriété qu'ils possèdent d'absorber des quantités considérables de calcium, même sur des terrains très pauvres en cette substance, la proportion de calcium fixée dans ces conditions étant peu inférieure à celle que les végétaux calcicoles ou indifférents prennent dans les sols calcaires.

Je rappelle à ce sujet les travaux de Fliche et Grandeau, analysés dans le chapitre I, et l'opinion de Dehérain sur les résultats de ces auteurs.

Cherchant une explication aux conclusions en apparence paradoxales de Fliche et Grandeau, j'ai été amenée à supposer que :

1° Toutes les plantes vertes, — qu'elles soient calcicoles ou calcifuges, — ont à peu près le même *besoin de calcium*, puisqu'on trouve sensiblement la même proportion de cet élément *fixée* par les unes et par les autres lorsqu'elles se sont développées normalement.

2° La *dose toxique* produisant un même effet nuisible doit être aussi à peu près la même dans tous les cas, — à condition de considérer là encore la quantité *fixée* par le végétal et non pas celle existant dans le substratum. Bien entendu, la concentration de l'élément dans le milieu a de l'importance, puisqu'elle influe sur la proportion fixée, mais il est évident que l'action toxique est due à ce qui a été *absorbé* par le végétal.

3° Les plantes calcifuges diffèrent seulement des calcicoles en ce qu'elles possèdent la faculté de *fixer le calcium en plus grande quantité pour une même proportion de cet élément dans le milieu.*

Pour vérifier ces hypothèses, il me fallait, dans des expériences analogues à celles du paragraphe précédent, *doser le calcium fixé*, et montrer que soit l'optimum, soit l'action toxique se manifestent dans tous les cas pour la même proportion de calcium fixée, celle-ci pouvant correspondre à des teneurs très différentes du milieu en calcium.

L'optimum, dans le cas de l'action du calcium, correspondant à un plateau, j'ai jugé plus précis de choisir pour la comparaison, la dose représentant la *limite inférieure de toxicité*, c'est-à-dire celle pour laquelle on obtient le même développement que dans l'eau redistillée.

Mes expériences ont porté sur le *pois*, le *lupin blanc* et le *lupin jaune*. J'ai choisi ces végétaux parce qu'ils présentent le quadruple avantage d'appartenir à une même famille, de se développer avec des vitesses comparables, de donner rapidement des poids de récolte suffisants pour permettre des dosages et enfin de représenter, au point de vue de la résistance au calcium du milieu, trois types bien distincts : la première espèce étant *calcicole*, la deuxième plutôt *indifférente* (1) et la troisième nettement *calcifuge* (2). Nous avons vu que cette classification a été vérifiée par le résultat de mes précédentes recherches (p. 138).

Ce que nous savons sur l'antagonisme des sels nous indique que ce qui importe au point de vue de l'action toxique n'est pas la quantité absolue de calcium fixée, mais la proportion relative comparativement aux autres éléments minéraux. Je rapporte donc les résultats des dosages de calcium au poids des cendres. Dans les cendres recarbonatées, le calcium se trouvant

1. Dehérain et Demoussy. 1900, *C. R. Ac. Sc.*, t. CXXX, p. 20.
2. Dehérain et Demoussy. 1902, *C. R. Ac. Sc.*, t. CXXXV, p. 445.

à l'état de carbonate, j'exprime les résultats en $CO^3Ca$ 0 0 du poids des cendres.

Pour plus de précision dans la détermination de la limite inférieure de toxicité, j'indique non seulement la longueur des différentes parties du végétal, mais aussi le poids sec.

L'expérience a duré 12 jours dans le cas du pois, 11 jours dans celui des lupins. Elle a été faite parallèlement pour ces derniers végétaux ; à une date différente, mais dans des conditions identiques pour le pois.

Les mesures ont été effectuées pour le pois sur 7 à 8 plants par milieu ; pour les lupins, sur 5 ou 6.

| | $NO^3Ca$ par litre | Longueur moyenne : Partie aérienne | Longueur moyenne : Racine | Longueur moyenne : Plante totale | Poids sec moyen d'un plant | $CO^3Ca$ % du poids des cendres |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Pois :* | | | | | | |
| | grammes | millim. | millim. | millim. | milligr. | p. 100 |
| I | 0 | 43 | 70 | 113 | 36,2 | 5,0 |
| II | 1 | 77 | 120 | 197 | 66,4 | 27,5 |
| III | 5 | 54 | 102 | 156 | 51,2 | 37,0 |
| IV | 10 | 44 | 59 | 103 | 36,7 | 42,7 |
| V | 20 | 21 | 41 | 62 | 27,0 | 51,2 |
| *Lupin blanc :* | | | | | | |
| | grammes | millim. | millim. | millim. | milligr. | p. 100 |
| I | 0 | 18 | 50 | 68 | 56,6 | 5,7 |
| II | 1 | 34 | 114 | 148 | 87,6 | 28,7 |
| III | 5 | 25 | 114 | 139 | 68,7 | 41,5 |
| IV | 10 | 13 | 45 | 58 | 46,8 | 54,5 |
| V | 20 | 9 | 24 | 33 | 29,8 | 59,0 |
| *Lupin jaune :* | | | | | | |
| | grammes | millim. | millim. | millim, | milligr. | p. 100 |
| I | 0 | 37 | 24 | 61 | 28,0 | 7,0 |
| II | 1 | 39 | 47 | 86 | 32,6 | 31,2 |
| III | 5 | 20 | 35 | 55 | 25,0 | 52,2 |
| IV | 10 | 9 | 20 | 29 | 15,4 | 83,2 |
| V | 20 | 6 | 13 | 19 | 13,4 | 85,5 |

Au point de vue de la *relation entre la toxicité et la teneur du milieu en calcium*, cette expérience confirme ce qui a été dit précédemment (p. 141). Le milieu commence à devenir toxique :

à 10 gr. de $(NO^3)^2Ca$ par litre pour le *pois* ;

(Poids sec : 36 mgr. 2 sur eau redistillée ; 36 mgr. 7 sur le milieu IV)

entre 5 et 10 gr. pour le *lupin blanc* ;

(Poids sec : 56 mgr. 6 sur eau redistillée ; 57 mgr. 7, moyenne entre III et IV)

un peu au-dessous de 5 gr. pour le *lupin jaune*.

(Poids sec : 28 mgr. sur eau redistillée ; 25 mgr. sur le milieu III)

Au point de vue de la *proportion fixée*, le calcium devient toxique dans les trois cas, lorsqu'il constitue, sous forme de carbonate, à peu près la moitié du poids des cendres :

42,7 0/0 pour le *pois* (milieu IV) ;

48 0/0 pour le *lupin blanc* (moyenne calculée entre III et IV) ;

52,2 0/0 pour le *lupin jaune* (milieu III).

S'il existe une différence, l'examen de ces derniers chiffres semble plutôt prouver que les plantes, telles que le pois, qui peuvent supporter les milieux les plus riches en calcium, sont précisément celles qui sont intoxiquées par les plus faibles proportions fixées.

Cette dernière expérience portant seulement sur des germinations, j'ai voulu confirmer et généraliser les résultats obtenus en effectuant des cultures complètes des mêmes végétaux sur *terre de bruyère additionnée de quantités croissantes de carbonate de calcium*, de façon à avoir la série suivante :

Teneur en $CO^3Ca$ : 0 0/0, 1 0/0, 2,5 0/0, 5 0/0, 10 0/0, 25 0/0.

J'ai déjà eu l'occasion de signaler la difficulté que l'on éprouve lorsqu'on veut cultiver du lupin jaune ; le mauvais développement de ce végétal m'a forcée d'arrêter cette expérience après 3 semaines de végétation, alors qu'aucune différence appréciable n'apparaissait encore entre les plantes obtenues dans les divers milieux.

J'ai pourtant dosé le calcium fixé lorsque le nombre des plantes récoltées a été suffisant pour permettre le dosage.

Voici les chiffres trouvés :

| Teneur de la terre de bruyère en $CO^3Ca$ | $CO^3Ca$ % du poids des cendres | | |
|---|---|---|---|
| | Pois | L. blanc | L. jaune |
| — | — | — | — |
| 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 |
| 1 . . . . . | 12,6 | 12,6 | 15,8 |
| 5 . . . . . | 15,6 | 16,0 | 23,9 |
| 25 . . . . . | 19,1 | 20,5 | 27,7 |

Là encore, on voit que les plantes calcifuges fixent beaucoup plus de calcium que les autres, mais on ne peut tirer de cette expérience aucune conclusion au point de vue de la dose toxique, puisque la culture n'a pas duré assez longtemps pour permettre de noter l'apparition de l'action nocive.

Du reste, une grave difficulté se présente lorsqu'on veut cultiver comparativement des Légumineuses sur un terrain naturel. On sait que ces plantes ne se développent bien qu'à la condition que des nodosités apparaissent sur leurs racines ; la présence ou l'absence de bactéridies dans le sol peuvent fausser les résultats ; on sait aussi que la teneur du milieu en carbonate de calcium a une certaine influence sur la multiplication des bactéridies, d'où une deuxième cause d'erreur.

Pour les Légumineuses, il est donc préférable de s'en tenir aux résultats donnés par les germinations, les bactéridies n'intervenant pas dans ce cas. Si l'on veut faire des essais de culture complète, il est nécessaire de s'adresser à d'autres végétaux. Le choix en est un peu difficile ; en effet, il faut des espèces voisines, les unes calcicoles, les autres calcifuges, évoluant en des temps comparables et donnant assez rapidement des poids de récolte permettant les dosages.

Ces deux dernières conditions sont importantes ; j'ai pu m'en assurer par des tentatives de culture de *genêt à balai* (*Sarothamnius scoparius*). Cette espèce est la plus caractéristique des terrains siliceux ; elle présente une sensibilité toute particulière à l'action du calcium. Les résultats que j'ai obtenus en la cultivant sur terre de bruyère additionnée de $CO^3Ca$ vérifient cette extraordinaire sensibilité :

| | | | |
|---|---|---|---|
| Teneur du milieu en $CO^3Ca$ : | 0 0/0 ; | 1 0/0 ; | 5 0/0. |
| Longueur moyenne des tiges : | 22 cc. ; | 19 cc. ; | 5 cc. |

Cette espèce semblerait donc devoir se prêter très bien aux recherches qui nous intéressent, mais outre qu'elle présente l'inconvénient d'appartenir au groupe des Légumineuses, elle évolue avec une extrême lenteur, et même après quatre mois de végétation, elle donne une récolte si peu abondante comme masse qu'il est bien difficile de songer à y doser le calcium avec quelque exactitude. En admettant même qu'on y parvienne, il faudrait pouvoir comparer les résultats avec ceux obtenus pour une plante calcicole de la même famille, du même âge et au même état de développement.

Il serait peut-être possible de trouver dans la famille des Graminées ou dans celle des Caryophyllées des espèces remplissant toutes les conditions désirables. J'ai aussi pensé à m'adresser pour ces recherches aux deux espèces de pins étudiées par Fliche et Grandeau : le pin maritime calcifuge et le pin noir d'Autriche calcicole. Enfin le groupe des Mousses pourrait peut-être fournir un matériel satisfaisant pour cette étude.

Malgré tout ce que les expériences que je donne ici ont d'incomplet, elles semblent pourtant bien confirmer les hypothèses émises plus haut. En effet, elles paraissent démontrer que :

1° *Les plantes calcifuges sont des plantes douées d'un grand pouvoir absorbant vis-à-vis du calcium.* — Ces plantes vivent de préférence sur des terrains pauvres en chaux, parce que grâce à leur grande faculté d'assimilation, elles sont capables d'y puiser une quantité de calcium suffisante pour leur développement, cette quantité n'étant pourtant pas inférieure à celle utile aux autres végétaux. Elles fuient les terrains calcaires, parce que les quantités de calcium qu'elles y prennent sont très considérables et atteignent très vite la dose toxique.

2° *Les végétaux calcicoles sont au contraire ceux qui possèdent un très faible pouvoir d'absorption vis-à-vis du calcium ;* d'où nécessité de leur fournir des terrains riches en chaux, mais aussi faculté pour eux de vivre sur des sols très fortement calcaires sans en souffrir.

Au point de vue de la pratique agricole, ces recherches montrent que l'analyse des cendres ne peut pas guider sur le choix des terrains qui conviennent à certaines espèces ou sur la nature des engrais qu'il faut leur fournir, puisque ce sont précisément les végétaux les plus riches en chaux qui demandent les terrains les moins calcaires et inversement. A l'appui de cette opinion, je rappellerai le cas du blé qui ne pousse pas sur les terrains siliceux et dont les cendres sont pourtant très pauvres en calcium.

---

# CONCLUSIONS

Au début de chacun des chapitres se rapportant à la partie expérimentale de ce travail (Chap. III et IV), j'ai exposé le but que je me proposais d'atteindre en entreprenant ces recherches sur le rôle du calcium dans la végétation.

Au point de vue des *végétaux inférieurs*, il s'agissait surtout de déterminer si le calcium, considéré le plus souvent comme inutile au développement de ces organismes, n'intervenait pas en réalité dans leur biologie en tant qu'élément catalytique.

Pour les *végétaux supérieurs*, le problème étant plus complexe se posait avec moins de netteté. Sans prétendre parvenir à le résoudre entièrement, il était possible d'essayer de jeter quelque lumière sur des points encore discutés. Parmi ceux-ci, l'influence du calcium dans la germination, le rôle antitoxique de ce métal, la question des plantes calcicoles et calcifuges présentaient le plus grand intérêt.

Quels sont les résultats qui ont été obtenus ?

I. **Végétaux inférieurs.** — Des expériences effectuées sur l'*Aspergillus niger*, j'ai pu tirer les conclusions suivantes :

1° Les petites quantités de calcium (0 mgr. 25 à 10 mgr. par 250 cc. de liquide nutritif), introduites dans un milieu bien purifié au point de vue de la présence de cet élément, ne déterminent aucune amélioration de croissance.

Les doses plus élevées (50 et 100 mgr. par exemple), produisent une légère augmentation de poids.

Au-dessus de 1 gr. le calcium devient toxique.

2° Les faibles augmentations de poids, observées pour les doses

de calcium voisines de 100 mgr. par 250 cc. de milieu, sont dues à la fixation du métal sous forme d'oxalate, et aussi à l'action favorisante du soufre lorsque le sel ajouté est un sulfate.

3° Dans les cultures âgées, la différence de poids entre les récoltes provenant des milieux avec et sans calcium doit être attribuée, aussi en partie, au ralentissement de l'autolyse.

4° Dans aucun cas, je n'ai pu constater que le calcium ait, par lui-même, exercé une action favorisante sur la croissance de l'*Aspergillus*.

Si ce métal agit, ce ne peut être qu'à des doses inférieures au 1/20 de mgr. (limite de sensibilité de la méthode de dosage) : son rôle serait alors catalytique.

Mais aucun fait, jusqu'à présent, n'a permis d'affirmer l'existence de ce rôle, car la seule fonction catalytique du calcium bien établie chez les végétaux est strictement limitée aux plantes supérieures (fermentation pectique).

5° Je n'ai pas non plus observé que le calcium intervienne comme élément antitoxique chez les champignons, lorsque la concentration du milieu augmente.

6° Jusqu'à nouvel ordre, le calcium paraît donc se comporter, vis-à-vis des végétaux inférieurs, en *élément indifférent*.

J'ai vérifié sur le *Penicillium glaucum*, une partie de ces résultats.

Incidemment, j'ai été amenée à m'occuper chez l'*Aspergillus niger* de la question de l'*acide oxalique*.

J'ai pu montrer que :

1° Cet acide est secrété normalement par le champignon cultivé sur liquide de Raulin ; cette production d'acide débute plus ou moins tôt suivant les races d'*Aspergillus* ; elle semble être en relation avec l'épuisement du liquide nutritif et résulter, en partie au moins, de la destruction de la substance du champignon par autolyse.

2° La quantité d'acide oxalique produite est la même lorsque le mycélium est abandonné, soit sur le liquide de Raulin ayant servi à son développement, soit sur de l'eau distillée, ou simplement dans une atmosphère humide.

3° Si dans le milieu existe un sel de calcium, l'acide oxalique, au lieu d'être déversé à l'extérieur, est fixé dans le mycélium à l'état d'oxalate de calcium.

4° La présence d'un sel de calcium (sulfate ou nitrate), loin de favoriser la formation de l'acide oxalique, l'entrave au contraire très sensiblement ; cet empêchement est sans doute la conséquence du ralentissement de l'autolyse produite indirectement par les sels de calcium.

II. **Végétaux supérieurs.** — Des expériences sur des plantes variées (*pois*, *lupins*, *maïs*, *blé*, *lin*) m'ont permis d'établir les faits suivants :

1° En milieu nutritif complet, le rôle du calcium paraît être à la fois *nutritif* et *antitoxique*.

2° En solution dans l'eau distillée pure et en l'absence de tout autre élément, les sels de calcium (sulfate, nitrate, chlorure), à la dose moyenne de 500 mgr. par litre, exercent une *action favorisante sur la germination* des végétaux étudiés.

3° A des concentrations analogues, les sels de magnésium, de potassium et d'ammonium sont nettement toxiques, surtout pour le pois, le lupin blanc, le lupin jaune et le lin, le maïs et le blé sont un peu plus résistants. L'addition d'un sel de calcium *supprime l'action nocive* de ces composés.

En présence de calcium, le rôle nutritif des sels de magnésium, de potassium et d'ammonium est, durant les premiers jours du développement, nul ou très peu marqué.

4° La teneur du milieu en calcium pour laquelle apparaît la *toxicité* de cet élément est toujours relativement élevée ; elle varie avec la nature du végétal.

5° Les plantes *calcifuges* et *calcicoles* ne se distinguent pas par une sensibilité plus ou moins grande à l'action toxique du calcium ou par un besoin plus ou moins considérable de cet

aliment, mais par une faculté d'absorption différente vis-à-vis de ce corps : les plantes calcifuges étant celles capables de fixer le plus de calcium, les plantes calcicoles celles en absorbant le moins.

Les résultats que je viens d'exposer contribueront, j'espère, à élucider le rôle du calcium chez les végétaux supérieurs, mais il reste à résoudre de nombreux problèmes qui nécessitèrent de multiples expériences. J'espère pouvoir continuer ces travaux et apporter de nouveaux faits pour compléter les données déjà acquises.

# BIBLIOGRAPHIE


Acqua 1889. Contribuzione alla studio dei cristalli di ossalato di calcio nelle piante (*Ann. d. R. Inst. Bot. di Roma*, t. III, p. 109).

— 1889. Nuovo contribuzione, etc. (*Malpighia*, t. III, p. 17).

— 1889. Alcune osservazioni sul luogo d'origine d'ossalato di calcio (*Malpighia*, t. III, p. 160).

Aé. 1869. Ueber die physiologische Bedeutung des den Pflanzen vorkommenden oxalsauren Kalkes (*Flora*, t. XXVII, p. 177).

Alberti (Alb.). 1890. L'ossalato di calcio nelle foglie (*Boll. d. soc. ital. d. microsc.*, t. I).

Amar. 1903. Sur le rôle de l'oxalate de calcium dans la nutrition des végétaux (*C. R. Ac Sc* , t. CXXXVI, p. 901 ; t. CXXXVII, p. 1301).

— 1904. Id. (*Thèse Doctorat*, Paris).

André. 1909. Chimie agricole, I. Chimie végétale.

1913. Chimie agricole, II. Chimie du sol.

Aso. 1902. On the influence of different ratios of lime and magnesia on the development of plants (*Bull. Coll. Agric. Imp. Univ. Tokyo*, t. IV, p. 361).

— 1902. On the lime content of phanerogamic parasites (*Bull. Coll. Agric. Imp. Univ. Tokyo*, t. IV, p. 387).

— 1902. On the different forms of Lime in Plants (*Bull. Coll. Agric. Imp. Univ. Tokyo*, t. V, p. 239).

— 1904. On the influence of different ratios of Lime to Magnesia on the growth of Rice (*Bull. Coll. Agric. Imp. Univ. Tokyo*, t. VI, p. 97).

— 1909. Id. (*J. Coll. Agric. Tokyo*, t. I, p. 171).

— 1909. Influence of the Ratio of Lime to Magnesia on the yield in Sand cultures (*J. Coll. Agric. Tokyo*, t. I, p. 175).

Becquerel (Paul). 1904. Sur la germination des spores d'Atrichum undulatum et d'Hypnum velutinum et sur la nutrition de leurs protonémas dans les milieux liquides stériles (*C. R. A. Sc.*, t. CXXXIX, p. 745).

— 1906. Id. (*Revue gén. Bot.*, t. XVIII, p. 49).

Belzung. 1892. Recherches chimiques sur la germination et les cristallisations intra-cellulaires artificielles (*Ann. Sc. nat. Bot*, 7e série, t. XV, p. 203).

Belzung et Poirault. 1892. Sur les sels de l'Angiopteris evecta et en particulier le malate neutre de calcium (*Journ. de Bot.*, t. VI, p. 286).

Benecke. 1894. Ein Beitrag zur mineralischen Nahrung der Pflanzen (*Ber. deut. Bot. Ges.*, t. XII, p. 105).

— 1894. Ueber die mineralische Nahrung der Pflanzen insonderheit der Schimmelpilze (*Bot. Centralbl.*, t. LX, p. 195).

— 1895. Die zur Ernährung der Schimmelpilze nothwendigen Metalle (*Jahrb. f. wiss. Bot.*, t. XXVIII, p. 487).

— 1896. Die Bedeutung des Kaliums und des Magnesiums für Entwickelung und Wachsthum des Aspergillus niger sowie einiger anderer Pilz formen (*Bot. Zeitg*, t. LIV, p. 97).

— 1898. Ueber Culturbingungen einiger Algen (*Bot. Zeitg.*, t. LVI, p. 83).

— 1903. Ueber Oxalsäurebildung in grünen Pflanzen (*Bot. Zeitg.*, t. LXI, p. 79).

— 1904. Einige neuere Untersuchungen über den Einfluss von Mineralsalzen auf Organismen (*Bot. Zeitg*, t. LXII, p 97).

— 1907. Ueber die giftwirkung verschiedener Salze auf Spirogyra und ihre Entgiftung durch Calciumsalze (*Ber. deut. bot. Ges.*, t. XXV, p. 322).

Bernardini. 1912. Sulla composizione chimica dell' embrione del riso (*Rendic. R. Accad. Lincei*, t. XXI, p. 283).

Bernardini et Corso 1907. Intorno all' influenza di vari rapporti fra Calce e Magnesia sullo sviluppo delle piante (*Ann. d. R. Scuola sup. Agric. di Portici*, t. VII).

— 1908. Id. (*Staz. Agr. Sperim. Ital.*, t. XLI, fasc. 2-4).

Bernardini et Siniscalchi. 1909. Intorno all' influenza, etc. (*Staz. Agr. Sperim. Ital.*, t. XLII, fasc. 4-6).

Bernardini et Morelli. 1912. Sull' ufficio fisiologico del Magnesio nella pianta verde (*Rendic. R. Accad. Lincei*, t. XXI, p. 357).

Berthelot et André. 1887. Recherches sur l'acide oxalique dans la végétation (*Ann. Ch. Ph.*, 6e série, t. X, p. 289).

Berthier. 1826. Analyse des cendres de diverses espèces de bois (*Ann. Ph. Ch.*, 2e série, t. XXXII, p. 240)

Bertrand et Mallèvre. 1894. Sur la pectase et sur la fermentation pectique (*C. R. Ac. Sc.*, t. CXIX, p. 1012).

— 1895. Id. (*C. R. Ac. Sc.*, t. CXX, p. 110).

— . 1895. Recherches sur la pectase et la fermentation pectique (*Bull. Soc. Ch.*, 3e série, t. XIII, pp. 77 et 252).

— 1895. Sur la diffusion de la pectase dans le règne végétal et sur la préparation de cette diastase (*C. R Ac. Sc.*, t. CXXI, p. 726).

Bobierre. 1872. Etudes chimiques sur la végétation des landes de Bretagne (*Ann. Ch. Ph.*, 4e série, t. XXV, p. 250).

Bœhm. 1875. Ueber den vegetabilischen Nährwerth der Kalksalze (*Sitb. Akad. Wiss. Wien*, t. LXXXI, p. 287).

Bokorny. 1895. Ueber den Einfluss des Calciums und Magnesiums auf die Ausbildung der Zellorgane (*Bot. Centralbl.*, t. LII, p. 1).

— 1912. Einwirkung von Metallsalzen auf Hefe und andere Pilze (*Centralbl. f. Bakt.*, II, t. XXXV, p. 118).

Borodine. 1892. Sur le dépôt diffus d'oxalate de chaux dans les feuilles (*Travaux de la Soc des natur. de St-Pétersbourg* (en russe), analysé dans *Rev. gén. Bot*, t. VII, p. 238).

Boussingault. 1860. Agronomie, Chimie agricole et physiologie : De l'action du phosphate de chaux des engrais sur le développement des plantes, t. I, p. 236.

Braconnot. 1825. Recherches sur un nouvel acide universellement répandu dans tous les végétaux (*Ann. Ch. Ph.*, 2e série, t. XXVIII, p. 173).

Bruch. 1901. Zur physiologischen Bedeutung des Calciums in den Pflanzen (*Landw. Jahrb.* cité d'après Benecke).

Buromsky. 1912. Die Salze Zn, Mg und Ca, K und Na und ihr Einfluss auf die Entwicklung von Aspergillus niger (*Centralbl. f. Bakt.*, II, t. XXXVI, p. 54).

Chancerel. 1914. Le rôle du calcium dans la végétation forestière (*Rev. gén. Bot.*, t. XXV *bis*, p. 83).

Charpentier. 1905. Sterigmatocystis nigra et acide oxalique (*C. R. Ac. Sc.*, t. CXLI, p. 367 et 429).

Chatin. 1852. Recherches expérimentales relatives à l'action qu'exercent sur la végétation des sels employés à équivalents chimiques égaux (*C. R. Ac. Sc.*, t. XXXV, p. 786).

— 1854. Id. (*C. R. Ac. Sc.*, t. XXXVIII, p. 269).

Church. 1879. A chemical study of vegetable albinism (*Journ. Ch. Soc*, t. XXXV, p. 33).

— 1886. Id. (*Journ. Ch. Soc.*, t. XLIX, p. 839).

Colin et de Rufz de Lavison. 1910. Absorption comparée des sels de Ba, de Sr, de Ca par la plante vivante (*Rev. gén. Bot.*, t. XXII, p. 337).

Contejean. 1875. Influence du calcaire sur la dispersion des plantes dites calcifuges (*C. R. Ac. Sc.*, t. LXXXI, p. 51).

— 1879. Pourquoi l'on rencontre quelquefois les plantes du calcaire associées à celles de la silice (*C. R. Ac. Sc.*, t. LXXXVIII, p. 872).

Correns. 1896. Zur Physiologie von Drosera rotundifolia (*Bot. Zeitg.*, t. LIV, p. 21).

Coupin. 1900. Sur la toxicité des composés alcalino-terreux à l'égard des végétaux supérieurs (*C. R. Ac. Sc.*, t. CXXX, p. 791).

— 1900. Sur la toxicité des composés du sodium, du potassium et de l'ammonium à l'égard des végétaux supérieurs (*Rev. gén. Bot.*, t. XII, p. 177).

— 1901. Sur la sensibilité des végétaux supérieurs à des doses très faibles de substances toxiques (*C. R. Ac. Sc*, t. CXXXII, p. 645).

Czapeck. 1907. Die Ernährungsphysiologie der Pflanzen seit 1896 (*Progr. Rei Botanicæ*, t. I, p. 419).

Czapeck. 1913. Biochemie den Pflanzen, 2e éd.

Daikuhara. 1903. On the influence of different ratios between Lime and Magnesia upon the development of Phaseolus (*Bull. Coll. Agr. Imp. Univ. Tokyo*, t. V, p. 501).

— 1905. Correction of a very unfavorable ratio of Lime to Magnesia in a soil for the culture of Barley (*Bull. Imp. Agr. experim. Station Japan*, t. I, p. 13).

— 1905. On the lime factor for the Tobacco plant (*Bull. Imp. Agr. experim. Station, Japan*, t. I, p. 17).

Daniel. 1891. Note sur l'influence du drainage et de la chaux sur la végétation spontanée dans le département de la Mayenne (*Rev. gén. Bot.*, t. III, p. 249).

Dassouville. 1898. Action des différents sels sur la structure des plantes (*C. R. Ac. Sc.*, t. CXXVI, p. 856).

Dehérain 1858. Sur les transformations que le phosphate de chaux éprouve dans le sol (*C. R. Ac. Sc*, t. XLVII, p. 988).

— 1863. Sur le plâtrage des terres arables (*C. R. Ac. Sc.*, t. LVI, p. 965).

— 1902. Traité de Chimie agricole, 2e éd.

Dehérain et Bréal. 1883 Recherches sur l'influence des matières minérales dans la germination (*Ann Agron.*, t. IX, p. 58).

Dehérain et Demoussy. 1900. Sur la culture des Lupins blancs (*C. R. Ac. Sc.*, t. CXXX, p. 20).

— 1900. Sur la culture des Lupins bleus (*C. R. Ac. Sc.*, t. CXXX, p. 465).

— 1901. Sur la germination dans l'eau distillée (*C. R. Ac. Sc.*, t. CXXXII, p. 523).

— 1901. Sur la culture du trêfle dans les terres privées de calcaire (*C. R. Ac. Sc.*, t. CXXXIII, p. 1174).

— 1902. Culture de la luzerne sur des terres sans calcaire (*C. R. Ac. Sc.*, t. CXXXIV, p. 75).

— 1902. Culture du Lupin jaune (*C. R. Ac. Sc.*, t. CXXXV, p. 445).

Demoussy. 1898. Absorption élective de quelques éléments minéraux par les plantes (*C. R. Ac. Sc.*, t. CXXVII, p. 970).

— 1899. Absorption par les plantes de quelques sels solubles (*Thèse Doctorat*, Paris).

Drude. 1897. Géographie botanique (Trad. G. Poirault. Paris).

Duclaux. 1883. Chimie biologique.

— 1898. Traité de Microbiologie.

Engberding. 1909. Vergleichende Untersuchungen über die Bakterienzahl im Ackerboden in ihrer Abhängigkeit von aüsseren Einflüssen (*Centralbl. f. Bakt.*, II, t. LIII, p. 569).

Fischer. 1883. Ueber das Vorkommen von Gypskrystallen bei den Desmidieen (*Jahrb. f. wiss. Bot.*, t. XIV, p. 133).

— 1905. Beitrag zur Kenntnis der Lebensbedingungen von Stickstoff sammelnden Bakterien (*Centralbl. f. Bakt.*, II, t. XIV, p. 33).

— 1906. Id. (*Centralbl. f. Bakt.*, II, t. XV, p. 235).

FISCHER. 1909. Ueber den Einfluss des Kalkes auf die Bakterien eines Bodens (*Landw. Vers. Stat.*, t. LXX, p. 335).

FLAHAUT. 1907. Les progrès de la géographie botanique depuis 1884 (*Progressus Rei Botanicæ*, t. I, p. 243).

FLICHE et GRANDEAU. 1873. De l'influence de la composition chimique du sol sur la végétation du pin maritime (*Ann. Ch. Ph.*, 4e série, t. XXIX, p. 383).

— 1874. De l'influence de la composition chimique du sol sur la végétation du châtaignier (*Ann. Ch. Ph.*, 5e série, t. II, p. 354).

FRÉMY. 1839. Premiers essais sur la maturation des fruits. Recherches sur la pectine et l'acide pectique (*Journ. Pharm. et Bull. Soc. Pharm. Paris*, 2e série, t. XXVI, p. 368).

— 1883. Encyclopédie chimique : Chimie des végétaux, t. IX.

FURUTA. 1902. To what extent should a soil be limed? (*Bull. Coll. Agr. Imp. Univ. Tokyo*, t IV, p. 371).

GODLEWSKI. 1879. Zur Kenntniss der Ursachen der Formanderung etiolirter Pflanzen (*Bot. zeitg.*, t. XXXVII, p. 97).

GROOM. 1896. Preliminary note on the relation between calcium and the conduction of carbohydrates in plants (*Annals of Bot.*, t. X, p. 91).

GUFFROY. 1910. Calcaire, calcimétrie et plantes calcicoles (*Bull. Soc. Bot. France*, t. LVII, p. 232).

HANSEN. 1889. Ueber die Bedeutung der durch Alkohol in zellen bewirkten Calcium phosphate Ausscheidungen (*Flora*, t. XLVII, p. 408).

— 1889. Ueber Sphärokrystalle (*Arb. d. bot. Institut zu Würzburg*, t. III, cité d'après Belzung).

HASELHOFF. 1893. (*Landw. Jahrb.*, t. XXII, p. 851, cité d'après Lœw).

HASSACK. Ueber das Verhältniss von Pflanzen zu Bicarbonaten und über Kalk-incrustation (*Tubinger Arbeiten.*, t. II, p. 465, cité d'après Lœw).

HEIDEN. 1888. Ueber vegetationsversuche von Maïs und Erbsen in wässerigen Nahrstofflösungen (*Centralbl. f. Agric. Chem.*, t. XVII, p. 622).

HILGERS. 1867. Ueber das Auftreten der Krystalle von oxalsauren Kalk im Parenchym einiger Monocotylen (*Jahrb. f. wiss. Bot.*, t. VI, p. 285).

HOLFERT. 1890. Die Nährschicht der Samenschalen (*Flora*, t. XLVIII, p. 279).

HOLZNER. 1867. Ueber die physiologische Bedeutung des oxalsauren Kalkes (*Flora*, t. XXV, p. 497).

HORI. 1910. Haben die höheren Pilze Kalk nötig? (*Flora*, t. CI, p. 447).

JOULIE. 1889. Traitement chimique des maladies de la vigne (*Bull. Soc. Chim.*, 3e série, t. II, p. 280).

KANOMATA. 1908. On the depression of growth by large doses of Lime (*Bull. Coll. Agric. Imp. Univ. Tokyo*, t. VII, p. 599).

KLEIN. 1877. Ueber oxalsauren Kalk und globoïdartige Körper bei Algen (*Flora*, t. XXXV, p. 315).

KOHL 1889. Anatomisch-physiologische Untersuchung der Kalksalze und Kieselsaüre in der Pflanze (Marburg, 1889, cité d'après Jumelle. *Rev. gén. bot.*, t. II, p. 334).

— 1890. Zur physiologischen Bedeutung des Oxalsauren Kalkes in der Pflanze (*Bot. Centralbl.*, t. XLIV, p. 337).

Kraus. 1892. Ueber das Kalkoxalat der Baumrinden (*Bot. Centralbl.*, t. XLIX, p. 181).

— 1897. Ueber das Verhalten des Kalkoxalats beim Wachsen der Organe (*Flora*, t. LVIII, p. 54).

— 1911. Boden und Klima auf Kleinsten Raum (cité dans l'article : Sur les plantes caractéristiques du calcaire. *Rev. scient.*, t. LXXXVIII, p. 310).

Larue (P.). 1913. Le rapport chaux-magnésie en agriculture (*Rev. scient.*, t. XCII, p. 48).

Lassaigne. 1849. Sur le mode de transport des phosphates et carbonates de chaux dans les organes des plantes et sur l'influence qu'exercent ces sels calcaires dans l'acte de la germination et de la végétation (*C. R. Ac. Sc.*, t. XXVIII, p. 73).

— 1849. Id. (*Ann. Ch. Ph.*, 3e série, t. XXV, p. 346).

Laurent. 1899. Recherches expérimentales sur les maladies des plantes (*Ann. Inst. Past.*, t. XIII, p. 1).

Lidforss. 1896. Die Einwirkung von Mineralsalzen auf den Pollen (*Jahrb. f. wiss. Bot.*, t. XXIX, p. 36).

Liebenberg. 1881. Untersuchungen über die Rolle des Kalkes bei der Keimung von Samen (*Sitzb. Akad. Wiss. Wien*, t. LXXXIV, p. 405).

Lipman. 1910. On the lack of antagonism between Ca versus Mg and also between Ca versus Na (*Bot. Gaz.*, t. LI, p. 41).

Lœb. 1908. La dynamique des phénomènes de la vie (trad. Daudin et Schœffer, Paris).

Lœw. 1892. Ueber die physiologischen Functionen der Calcium-und Magnesiumsalze im Pflanzenorganismus (*Flora*, t. L, p. 368).

— 1892. Die Bedeutung der Kalk-und Magnesiasalze in der Landwirtschaft (*Landw. Vers. Stat.*, t. LIX, p. 467).

— 1895. Ueber das Mineralstoffbedürfniss des Pflanzenzellen (*Bot. Centralbl.*, t. LXIII, p. 161).

— 1895. Nachtrag über das Kalkbedürfniss der Algen (*Bot. Centralbl.*, t. LXIV, p. 433).

— 1898. Ueber die physiologischen Functionen der Calciumsalze (*Bot. Centralbl.*, t. LXXIV, p. 257).

— 1899. The physiological rôle of mineral nutrients (*Bull. of the U. S. dept. of Agric.*, n° 18).

— 1901. The relation of Lime and Magnesia (*Bull. Bur. Plant. Ind. U. S. dept. Agric.* n° 1).

— 1902. Lime factor for different crops (*Bull. Coll. Agric. Imp. Univ. Tokyo*, t. IV, p. 381).

— 1903. The physiological rôle of mineral nutrients in plants (*Bull. Bur. Pl. ind. U. S. Dept. Agric.*, n° 45).

— 1905 Ueber die Gifwirkung von Fluornatrium auf Pflanzen (*Flora*, t. XCIV, p. 330).

— 1908. Note on balanced solutions (*Bot. Gaz.*, t. XL, p. 302).

Lœw. 1911. Ueber die Wirkung von Strontiumsalzen auf Algen (*Flora*, t. CII, p. 96).

— 1912. Ueber die Giftwirkung von oxalsauren Salzen und die physiologische Funktion des Calciums (*Bioch. Zeitsch.*, t. XXXVIII, p. 226).

Lœw et Aso. 1905. On different degrees of availability of Plant Nutrients (*Bull. Coll. Agric. Imp. Univ. Tokyo*, t. VI, p. 335).

Lœw et Honda. 1896. Effects of different amounts of Lime and Magnesia on the development of Pine Trees (*Bull. Coll. Agric. Imp. Univ. Tokyo*, t. II, p. 378).

Lœw et May. 1901. Relation of Ca and Mg to plant growth (*Bull Bur. Plant. Ind. U. S. Dept. Agric.*, nº 1).

Magowan. 1908. The toxic effect of certain common salts on the soil on plants (*Bot. Gaz.*, t. XLV, p. 45).

Malaguti et Durocher. 1856. Recherches sur la répartition des éléments inorganiques dans les principales familles du règne végétal (*C. R. Ac. Sc.*, t. XLIII, p. 384, 446 et 482).

— 1858. Id. (*Ann. Ch. Ph*, 3e série, t. LIV, p. 257).

Mangin. 1888. Sur la constitution de la membrane des végétaux (*C. R. Ac. Sc.*, t. CVII, p. 144).

— 1889. Sur la présence des composés pectiques dans les végétaux (*C. R. Ac. Sc.*, t. CIX, p. 579).

— 1890. Sur la substance intercellulaire (*C. R. Ac. Sc.*, t. CX, p. 295).

— 1891-1892. Etude historique et critique sur la présence des composés pectiques dans les végétaux (*Journ. Bot.*, t. V, p. 400 et 440; t. VI, p. 12).

— 1892. Propriétés et réactions des composés pectiques (*Journ. Bot.*, t. VI, p. 206, 235 et 363).

— 1892. Sur la constitution des cystolithes et des membranes incrustées de carbonate de chaux (*C. R. Ac. Sc.*, t. CV, p. 260).

— 1893. Observations sur la constitution de la membrane chez les champignons (*C. R. Ac. Sc.*, t. CXVII p. 816).

Maquenne et Demoussy. 1910. Sur la toxicité de quelques sels à l'égard des feuilles vertes (*C. R. Ac. Sc.*, t. CLI, p. 178).

Marchal. 1901. Influence des sels minéraux nutritifs sur la production des nodosités chez le Pois (*C. R Ac. Sc.*, t. CXXXIII, p. 1032).

Masclef. 1892. Sur l'adaptation du Pteris aquilina aux sols calcaires (*Rev. gén. Bot.*, t IV, p. 7).

Mayer (Ad.). 1869. Untersuchungen über die alkoholische Gährung, den Stoffbedarf und den Stoffwechsel der Hefepflanze. (Heidelberg).

Mazé. 1911. Sur la chlorose expérimentale du maïs (*C. R. Ac. Sc.*, t. CLIII, p. 902).

— 1912. Recherches sur les relations de la plante avec les éléments nutritifs du sol. Loi du minimum et loi des rapports physiologiques (*C. R. Ac. Sc.*, t. CLIV, p. 1711).

Mazé, Ruot et Lemoigne. 1912. Recherches sur la chlorose végétale provoquée par le carbonate de calcium (*C. R. Ac. Sc.*, t. CLV, p. 435).

Mazé, Ruot et Lemoigne. 1913. Chlorose calcaire des plantes vertes Rôle des excrétions des racines dans l'absorption du fer des sols calcaires (*C. R. Ac. Sc.*, t. CLVII, p. 495)

— 1914. Étude de la chlorose des végétaux supérieurs attribuée à la richesse excessive des sols en calcaire (*Ann. Inst. Past.*, t. XXVIII, p. 47).

Meunier (J.). 1911. Sur la présence des sels de calcium dans les poussières de l'air (*Rev. scient.*, t. LXXXVIII, p. 305).

Miller. 1914. Ueber den Einfluss des Kalkes auf die Bodenbakterien (*Zeitschr. f. Gärungsphysiol.*, t. IV, p. 194).

Miyake. 1913. The influence of salts common in alkali soils upon the growth of the rice plant (*Journ. of Biol. Chem.*, t. XVI, p. 235).

Molisch. 1881. Ueber die Ablagerung von kohlensaurem Kalk im Stamme dicotyler Holz gewächse (*Sitzb. Akad. Wiss Wien*, t. LXXXIV, p. 7).

— 1894. Die mineralische Nahrung der niederen Pilze (*Sitzb. Akad. Wiss. Wien*, t. CIII, p. 554 ; *Bot. Centralbl.*, t. LX, p. 167).

— 1895-1896. Die Ernährung der Alzen Süsswasseralgen (*Sitzb. Akad. wiss. Wien.*, t. CIV, p. 799 ; t. CV, p. 633).

— 1896. Id. (*Bot. Centralbl.*, t. LXVIII, p. 146).

Monteverde. 1891. L'oxalate de chaux et l'oxalate de magnésie dans la plante (Saint-Pétersbourg, en russe. Analysé dans *Rev. gén. Bot.*, t. III, p. 536).

Mulder. 1838. Sur la composition de l'acide pectique et de la pectine (*Bull. des Sc. Phys. et Nat.*, en Néerlande, cité d'après Mangin).

Müller (Karl). 1890. Ueber die Entstehung von Kalkoxalat Krystallen in pflanzlichen zellmembranen (*Inaug. Dissert.* Leipzig).

Nægeli. 1881. Die Ernährung der niederen Pilze durch Mineralstoffe (*Bot. Mittlg.*, t. III, p. 458).

Namikawa. 1906. On the Lime-factor for Flax and Spinach (*Bull. Coll. Agric. Imp. Univ. Tokyo*, t. VII, p. 57).

Osterhout. 1906. Extreme toxicity of sodium chloride and its prevention by others salts (*J. Biol. Chem.*, 1906. t. I, p. 363)

— 1906-1907. On the importance of physiologically balanced solutions for plants.

I. Marine plants (*Bot. Gaz.*, t. XLII, p. 127).

II. Fresh-water and terrestrial plants (*Bot. gaz.*, t. XLIV, p. 259).

— 1907. On nutrient and balanced solutions (*Univ. of California Publ. Bot.*, t. II, p. 317).

— 1908. The antagonistic action of Mg and K (*Bot. Gaz.*, t. XLV, p. 117).

— 1909. The nature of balanced solutions (*Bot. Gaz.*, t. XLVII, p. 148).

— 1909. Die Schutzwirkung des Natriums für Pflanzen (*Jahrb. f. wiss. Bot.*, t. XLVI, p. 121).

— 1911. The permeability of living cells to salts in pure and balanced solutions (*Science*, t. XXIV).

— 1912. Plants which require Na (*Bot. Gaz.*, t. LIV, p. 532).

PALLADIN. 1891. Ergrünen und Wachsthum der etiolirten Blätter (*Ber. deut. bot. Ges.*, t. IX, p. 230).

— 1892. Aschengehalt der etiolirten Blätter (*Ber. deut. bot. Ges.*, t. X, p. 179).

PASTEUR. 1860. Mémoire sur la fermentation alcoolique (*Ann. Ch. Ph.*, 3e série, t. LVIII, p. 323).

PAYEN. 1843-1846. Mémoires sur le développement des végétaux : (*Mém. Ac. Sc. Sav. étr.*, t. VIII et IX).
5e mémoire : Concrétions et incrustations minérales, t. IX, p. 77.
7e mémoire : Composés à bases minérales dans les parois des cellules et les méats intercellulaires, t. IX, p. 148

— 1854. Sur le carbonate de chaux préexistant à l'état normal dans les plantes et son dosage (*C. R. Ac. Sc.*, t. XXXVIII, p. 241).

PELLET. 1879. Etude sur la composition générale des végétaux (*Ann. Ch. Ph.*, 5e série, t. XVII, p. 145).

PFEFFER. 1904-1906. Physiologie végétale (Trad. Friedel. Paris).

PICHARD. 1884. Action nitrifiante comparée de quelques sels contenus naturellement ou ajoutés dans les terres végétales (*C. R. Ac. Sc.*, t. XCVIII, p. 1289).

— 1889. Influence dans les terres nues du plâtre et de l'argile sur la conservation de l'azote, la fixation de l'azote atmosphérique et la nitrification (*C. R. Ac. Sc.*, t. CIX, p. 445).

— 1891. Influence comparée du sulfate de fer et du sulfate de chaux sur la conservation de l'azote dans les terres nues et sur la nitrification (*C. R. Ac. Sc.*, t. CXII, p. 1455).

PORTHEIM. 1901. Ueber die Nothwendigkeit des Kalkes für Keimlinge insbesondere bei höherer Temperatur (*Sitzb. Akad. Wiss. Wien.*, t. CX, p. 113).

PRIANISCHNIKOW. 1895. Zur Kenntnis der Keimungsvorgänge bei Vicia Sativa (*Landw. Vers. Stat.*, t. XLV, p. 247).

PRINGSHEIM. 1886. Ueber die Entstehung der Kalkincrustationen an Süsswasserpflanzen (*Jahrb. f. Wiss. Bot.*, t. XIX, p. 138).

RAULIN. 1870. Etudes chimiques sur la végétation (*Thèse Doctorat*, Paris).

RAUMER. 1883. Kalk und Magnesia in der Pflanze (*Landw. Vers. Stat.*, t. XXIX, p. 253).

RAUMER et KELLERMANN. 1880. Ueber die Function des Kalkes im Leben der Pflanze (*Landw. Vers. Stat.*, t. XXV, p. 25).

RICHTER. 1906. Zur Physiologie der Diatomeen (*Sitzb. Akad. Wiss. Wien.*, t. CXV, p. 27).

ROBERT (Th.). 1911. Influence du calcium sur le développement et la composition minérale de l'Aspergillus niger (*C. R. Ac. Sc.*, t. CLIII, p. 1175).

— 1912. Mode de fixation du calcium par l'Aspergillus niger (*C. R. Ac. Sc.*, t. CLIV, p. 1308).

— 1913. Rôle antitoxique du calcium vis-à-vis de quelques sels nutritifs dans la culture en milieu liquide du Pois et du Lupin (*C. R. Ac. Sc.*, t. CLVI, p. 915).

Robert (Th.). 1914. Fixation du calcium par les plantes calcifuges (*Bull. Soc. Ch. biol.*, t. I, p. 85).

Rufz de Lavison. 1910. Du mode de pénétration de quelques sels dans la plante vivante. Rôle de l'endoderme (*Rev. gén. Bot.*, t. XXII, p. 225).

— 1911. Essai sur une théorie de la nutrition minérale des plantes vasculaires basée sur la structure de la racine (*Rev. gén. Bot.*, t. XXIII, p. 177).

— 1911. Recherches sur la pénétration des sels dans le protoplasme et sur la nature de leur action toxique (*Ann. Sc. Nat. Bot.*, 9e série, t. XIV, p. 97).

Saussure (de). 1804. Recherches chimiques sur la végétation.

Sauton. 1912. Sur la nutrition du bacille tuberculeux (*C. R. Ac. Sc.*, t. CLV, p. 860).

Schimper. 1888. Ueber Kalkoxalatbildung in den Laublättern (*Bot. Zeitg.*, t. XLVI, p. 65).

— 1890. Zur Frage der Assimilation der Mineralsalze durch die grüne Pflanze (*Flora*, t. XLVIII, p. 207).

Schleiden. 1839 (*Mém. Ac. St-Pétersb.*, cité d'après Kraus, 1897).

Schweinitz et Dorsett. 1898. The mineral constituents of the tubercle bacilli (*Centralbl. f. Bakt.*, I, t. XXIII, p. 993).

Servettaz. 1913. Recherches expérimentales sur le développement et la nutrition des mousses en milieux stérilisés (*Ann. Sc. nat. Bot.*, 9e série, t. XVII, p. 111).

Stahl. 1900. Der Sinn der Mycorhizenbildung. XII. Verbreitung der Kalkoxalats bei autotrophen und mycotrophen Pflanzen (*Jahrb. f. wiss. Bot.*, t. XXXIV, p. 638).

Stiehr. 1903. Ueber das Verhalten der Wurzelhärchen gegen Lösungen (*Inaug. Dissert.*, Kiel, cité d'après Benecke, 1904).

Stohmann. 1862. Ueber einige Bedingungen der Vegetation der Pflanze (*Ann. chem. Pharm.*, t. CXXI, p. 285).

Susuki. 1899 (*Bull. Coll. Agric. Imp. Univ. Tokyo*, cité d'après Lœw).

— 1903. On the influence of a certain ratio between Lime and Magnesia on the growth of the Mulberry-Tree (*Bull. Coll. Agric. Imp. Univ. Tokyo*, t. V, p. 495).

— 1905. On the injurious effects of an excess of lime applied to the soil (*Bull. Coll. Agric. Imp. Univ. Tokyo*, t. VI, p. 347).

Takeuki. 1908. On the absorption of varying Amounts of Lime and Magnesia by plants (*Bull. Col. Agric. Imp. Univ. Tokyo*, t. VII, p. 579).

Tanret (Ch.). 1897. Action des nitrate, sulfate, chlorhydrate et phosphate d'ammoniaque sur l'Aspergillus niger (*Bull. Soc. Chim.*, 3e série, t. XVII, p. 914).

True et Bartlett. 1912. Absorption and excretion of salts by roots, as influenced by concentration and composition of culture solutions. I. Concentration relations of dilute solution of Calcium and Magnesium nitrates to pea roots (*Bull. Bur. Pl. ind. U. S. Dep. Agric.*, n° 231).

Tschirch. 1887. Die Kalkoxalat Krystalle in den Aleuronkörnern der Samen und ihre Function (*Bot. Centralbl.*, t. XXXI, p. 223).

Ulbricht. 1899. Vegetationsversuche in Töpfen über die Wirkung der Kalkerde und Magnesia in gebraunten Kalken und Mergeln (*Land. Vers. Stat.*, t. LII, p. 383).

— 1902. Id. (*Land. Vers. Stat.*, t. LVII, p. 103).

Vauquelin. 1829. Mémoire sur l'acide pectique et la racine de la carotte (*Ann. Ch. Ph.*, 2e série, t. XLI, p. 46).

Vries (de). 1881. Ueber die Bedentung der Kalkablagerungen in der Pflanze (*Landw. Jahrb.*, cité d'après Schimper, 1890).

Wahrlich. 1892. Ueber Calcium oxalat in der Pflanzen (*Inaug. Dissert.*, Marburg, analysé dans *Rev. gén. Bot.*, t. VII, p. 238).

Warthiadi. 1911. Veränderungen der Pflanze unter dem Einfluss von Kalk und Magnesia (*Dissert.* München, analysé dans *Bot. Centralbl.*, t. CXVII, p. 587).

Weber. 1875. Ueber den Einfluss farbigen Lichtes auf die Assimilation und die damit zusammenhängende Vermehrung der Aschenbestandtheile in Erbsen-Keimlingen (*Landw. Vers. Stat.*, t. XVIII, p. 18).

Wehmer. 1889. Das Verhalten den oxalsauren Kalkes in der Blättern von Symphoricarpus, Alnus und Cratœgus (*Bot. Zeitg.*, t. XLVII, p. 141).

— 1889. Das Calciumoxalat der oberirdischen Theile von Cratœgus oxyacantha in Herbst und Frühjahr (*Ber. deut. bot. Ges.*, t. VII, p. 216).

— 1891. Die oxalatabscheidung im Verlauf der Sprossentwickelung von Symphoricarpus racemosa (*Bot. Zeitg.*, t. XLIX, p. 149, 165 et 181).

— 1891. Entstehung und physiologische Bedeutung der oxalsaüre im Stoffwechsel einiger Pilze (*Bot. Zeitg.*, t. XLIX, p. 233, etc.).

— 1891. Ueber den Einfluss der Temperatur auf die Entstehung freier Oxalsäure in culturen von Aspergillus niger (*Ber. deut. bot. Ges.*, t. IX, p. 163).

— 1892. Zur Physiologie der Kakteen (*Monatsschrift f. Kakteenkunde*, cité d'après Jumelle. *Rev. gén. Bot.*).

Weir. 1911. Benötigt der Pilz Coprinus Kalksalze zu seinen physiologischen Funktionen ? (*Flora*, t. CIII, p. 87).

Winogradsky 1884. Ueber die Wirkung aüsserer einflüsse auf die Entwicklung von Mycoderma vini (*Bot. Centralbl.*, t XX, p. 165).

Wolf. 1864. Die Saussure'schen Gesetze der Aufsangung von einfachen Salzlösungen durch die Wurzeln der Pflanzen (*Landw. Vers. Stat.*, t. VI, p. 203).

# TABLE DES MATIÈRES


INTRODUCTION

Pages

*Classification des éléments chimiques d'après leur rôle dans la végétation* . . . . . 1

Méthode analytique et méthode synthétique. . . . . 1
Composition élémentaire des végétaux . . . . . 2
Degré d'utilité des différents éléments. . . . . 3
Leur mode d'action . . . . . 5
Remplacement des éléments les uns par les autres. . . . . 10

CHAPITRE PREMIER

*Exposé historique et critique du rôle physiologique du Calcium dans la végétation* . . . . . 13

I. — Thallophytes :
Champignons. . . . . 14
Algues . . . . . 20
Bactéries . . . . . 22
II. — Muscinées . . . . . 25
III. — Cryptogames vasculaires. . . . . 25
IV. — Phanérogames :
Emploi des composés calciques en agriculture . . . . 26
Répartition et forme du calcium dans la plante . . . . 29
Nécessité de cet élément . . . . . 34
Son mode d'action. . . . . 39

CHAPITRE II

*Méthodes de recherche et de dosage du Calcium* . . . . . 67

CHAPITRE III

Pages

*Rôle du Calcium chez les végétaux inférieurs* . . . . . 71

I. — Préparation du milieu de culture. Purification des produits. Technique . . . . . 72
II. — Action du calcium sur le développement de l'*Aspergillus niger*. . . . . 75
III. — Fixation du calcium par l'*Aspergillus niger* . . . . 76
IV. — Forme sous laquelle l'*Aspergillus niger* fixe le calcium . 81
V. — Mécanisme de la formation de l'oxalate de calcium par l'*Aspergillus niger* . . . . . 84
VI. — Interprétation de l'augmentation de poids du mycélium d'*Aspergillus niger* en présence de doses suffisantes de calcium . . . . . 91
VII. — Influence de l'addition de calcium sur les cultures âgées . 94
VIII. — Formation d'acide oxalique par autolyse du mycélium. . 97
IX. — Rôle antitoxique du calcium chez les végétaux inférieurs . 102
X. — Expériences sur le *Penicillium glaucum*. . . . . 106

CHAPITRE IV

*Rôle du Calcium chez les végétaux supérieurs*. . . . . 109

I. — Cultures en solution nutritive stérile additionnée de doses croissantes de calcium. . . . . 110
II. — Rôle antitoxique du calcium . . . . . 115
III. — Influence favorisante du calcium sur la germination . . 133
IV. — Courbe d'action du calcium sur la végétation en rapport avec sa concentration dans le milieu . . . . . 136
V. — Fixation du calcium par les plantes calcifuges . . . . 142

CONCLUSIONS

Végétaux inférieurs . . . . . 149
Végétaux supérieurs . . . . . 151

BIBLIOGRAPHIE

# SECONDE THÈSE

---

## PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

**Zoologie physiologique.** — Rôle physiologique du Calcium chez les animaux.

**Géologie.** — Formation et rôle des sédiments calciques.

VU ET APPROUVÉ :
Paris, le 16 octobre 1915.
*Le Doyen de la Faculté des Sciences,*
Paul APPELL

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :
*Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris,*
L. LIARD.

LAVAL. — IMPRIMERIE L. BARNEOUD ET Cie.